

IMT Lille Douai



Université de Sherbrooke



Université de Lille



**INSTITUT MINES-TELECOM LILLE-DOUAI
UNIVERSITE LILLE 1, Ecole Doctorale SMRE 104**

**UNIVERSITE DE SHERBROOKE
Faculté de génie – Département génie Civil**

Développement d'une méthode de réparation des matériaux cimentaires fissurés par biocicatrisation

Thèse de doctorat

Spécialité : Génie Civil

Ivan FEURGARD

Jury :

**Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice
Co-directeur**

Hubert CABANA (Pr.), Université de Sherbrooke
Sophie SABLE (HDR), Université de la Rochelle
Isam SHAHROUR (Pr.), Université Lille 1
Josée DUCHESNE (Pr.), Université de Laval
Christine LORS (Pr.), IMT Lille-Douai
Richard GAGNE (Pr.), Université de Sherbrooke

Douai, France

20 Décembre 2017

RÉSUMÉ

La maintenance des ouvrages en matériaux cimentaires fissurés a un coût économique et environnemental considérable, les méthodes de traitement actuelles étant polluantes et d'une efficacité limitée à long terme. La biocicatrisation, reposant sur la formation d'un dépôt de carbonate de calcium d'origine bactérienne au sein des fissures du matériau, est une alternative durable et écologique aux résines synthétiques. Cette thèse a pour objectif de créer une méthode de biocicatrisation de fissures d'ouvertures comprises entre 150 et 500 μm , en optimisant sa mise en œuvre pour une utilisation commerciale. Cette méthode repose sur l'injection de bactéries dans les fissures, par le biais d'un milieu épaissi favorisant la précipitation de CaCO_3 biosourcé. Pour ce faire, ce travail de thèse repose sur trois axes. Dans un premier temps, le milieu épaissi est créé puis ses propriétés rhéologiques sont optimisées à l'aide de mesures rhéologiques et d'essais d'injection dans des éprouvettes de mortier fissurées. Dans un deuxième temps, l'effet de l'épaississement du milieu sur la croissance de *B. pseudofirmus* et sur la bioproduction de carbonate de calcium est évalué. Enfin, des essais de biocicatrisation sont conduits en conditions contrôlées et en milieu extérieur sur des matériaux fissurés afin de vérifier le potentiel de cette méthode à différentes échelles allant de l'éprouvette de mortier à la dalle de béton. Les essais réalisés ont permis de formuler une suspension thixotropique et rhéofluidifiante en combinant deux épaississants, le Welan et l'Attigel. Cette suspension peut être injectée efficacement et sans drainage dans des fissures de 150 à 800 μm d'ouverture. L'ajout d'épaississants n'a pas d'impact sur la croissance de *B. pseudofirmus* et augmente la production de carbonate de calcium par les bactéries. Les essais de biocicatrisation ont démontré que l'utilisation de milieu épaissi contribue durablement au colmatage des fissures en formant un film solide lors de son séchage, et constitue un support au sein duquel les bactéries peuvent réaliser le processus de biocicatrisation malgré les fortes contraintes imposées par une utilisation *in situ*. À l'issue du traitement de biocicatrisation, la production de CaCO_3 au sein des fissures par la souche bactérienne d'étude, *B. pseudofirmus*, a pu être démontrée par des observations microscopiques (MEB). Les essais menés au cours de ce projet ont permis de mettre au point une méthode de biocicatrisation ayant un potentiel pour une utilisation commerciale, se démarquant par sa facilité d'emploi et le cumul entre colmatage abiotique et biologique.

Mots-clés : biocicatrisation/bactéries/béton/mortier/fissures/rhéologie/perméabilité/réparation

ABSTRACT

Maintenance of cracked cementitious materials comes at a high environmental and economic cost, as current repair technologies are polluting and lack long-term durability. Bio-healing, which relies on the clogging of cracks with bacterial calcium carbonate, is a durable and environment-friendly alternative to synthetic resins. Indeed, calcium carbonate, calcite in particular, is a long-lasting material, and bacterial activity does not require the use of any toxic chemicals. Based on a previous study proving the bio-healing potential of the bacteria *Bacillus pseudofirmus* under controlled conditions, this project aims to design a bio-healing method allowing to repair cracks from 150 to 500 μm wide and fitting commercial use. This method relies on the injection of bacteria in cracks, using a thickened medium which enhances CaCO_3 bioproduction.

To achieve this goal, the work was organized according to three phases. The first phase is to create and characterize the thickened medium through rheological measurements and injection tests in cracked mortars. For the second phase, the effect of the thickened medium on bacterial growth and bioproduction of CaCO_3 is assessed through growth experiments. For the third phase, bio-healing tests are performed in a controlled environment and outdoors on cracked materials in order to confirm the potential of this method for commercial use, for lab and pilot scales.

During the rheological experiments, we created a thixotropic and shear-thinning suspension using two thickeners in combination, Welan and Attagel. This suspension can be efficiently injected into 150 and 800 μm wide cracks without post-injection drainage. Adding thickeners does not alter bacterial growth, and increases CaCO_3 bioproduction. Biocicatrisation tests revealed that the use of a thickened suspension contributes to sealing of cracks as it dries to form a solid film inside the cracks, and embed the bacteria so they could precipitate significant amounts of CaCO_3 despite the constraints of in situ conditions. At the end of the bio-healing treatment, the strain *B. pseudofirmus* has been proven to precipitate CaCO_3 through SEM observations. The experiments which have been performed during this PhD led to the creation of a bio-healing method which holds a true potential for commercial use, as it is particularly easy to use and combines biotic and abiotic sealing of the cracks.

Keywords: *bio-healing/bacteria/mortar/concrete/cracks/rheology/permeability/repair*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Christine Lors et Richard Gagné pour leur support enthousiaste à mon projet et leur encadrement efficace m'ayant permis de réaliser cette thèse en cotutelle entre l'Université de Sherbrooke et l'IMT Lille-Douai dans les meilleures conditions. Je suis particulièrement reconnaissant à Richard Gagné pour son accueil chaleureux lors de mon arrivée au Québec et pour l'aide qu'il m'a fourni au cours de mes travaux à Sherbrooke, soutenant chaque réflexion scientifique avec dynamisme. Je remercie Christine Lors pour avoir été présente tout au long de ce projet et pour son travail de fond lors de la rédaction de ce manuscrit. Je remercie aussi M. Denis Damidot pour son importante participation lors des étapes préparatoires de ce doctorat, ayant apporté de nombreuses idées très utiles pour sa réalisation.

Je souhaite remercier toute l'équipe du labo béton pour sa convivialité et sa gentillesse, une équipe riche et très sympathique avec laquelle j'ai passé de très bons moments ! Un grand merci au groupe béton de Sherbrooke, en particulier Régis, Paco, Daddy et Linwen, qui m'ont aidé à utiliser le matériel indispensable pour mes expérimentations. Je remercie aussi Daniel Breton du Service de Mécanique Spécialisée qui a fabriqué les pièces du système d'injection et permis d'améliorer sa conception grâce à son expérience et à son sens pratique. Spéciale dédicace à la team Guépard de Sherbrooke/Granby ! Vous êtes peut-être pas des bétonneux ou des biologistes, mais je vous aime les gars, vous êtes les meilleurs ! Enfin, quand je dis « les gars », ça inclut les filles bien sûr ! Parce que bon, c'est quand même grâce à Popo et Lulu que j'ai rejoint la team Guépard, et grâce à Marie que je chante « Bohemian Rhapsody » comme un dieu. Vous qui m'avez accueilli, hébergé, imbibé, covoituré... On a intérêt à se revoir, j'vous le dis. Je remercie toute l'équipe du département de Génie Civil et Environnemental des Mines de Douai pour leur accueil chaleureux. Un grand merci aux techniciens du labo, Johanna, Ghislain, Damien en particulier pour leur contribution sans faille à mes travaux de laboratoire. Un gros big up à tous les non permanents de génie civil, qui de ce côté de l'océan ont mis grosse ambiance ! Je pourrais remercier Tristan, Mathilde, Coralie « les anciens » pour l'équipe des Grès, et puis Julie, Adrian, Marie pour l'équipe de l'Arhum, mais ce serait réducteur, on oublierait Antoine et Thomas les p'tits alternants qui ont subi nos vacheries de thésards avec bonne humeur, nos libanaïses qu'on adore et qu'on redoute à la fois, tonton Vincent Trincool et ses repas géants, Philippe le roi des jeux à boire... sans vous le séjour à Douai aurait pas été le même.

Et enfin, last but not least, un grand merci à ma famille et à mes amis de longue date, parce que sans eux, je ne serais pas arrivé au bout. J'ai de la chance de vous avoir.

TABLE DES MATIÈRES

Index des illustrations	1
Index des tableaux.....	8
Index des abréviations	10
Introduction.....	12
CHAPITRE 1. Etat de l'Art.....	15
1.1. Les matériaux cimentaires.....	15
1.1.1. Techniques conventionnelles de réparation	17
1.1.2. Mécanismes d'autocicatrisation naturelle.....	19
1.1.3. Facteurs influençant l'autocicatrisation naturelle	24
1.1.4. Techniques d'amélioration du potentiel d'autocicatrisation	30
1.2. La biominéralisation.....	35
1.2.1. Mécanisme de biominéralisation	36
1.2.2. Principales voies de biominéralisation microbienne	39
1.2.3. Impact du biofilm sur la biominéralisation	43
1.2.4. Morphologie du carbonate de calcium biosourcé	48
1.3. Biocicatrisation des matériaux cimentaires	52
1.3.1. Intérêt pour le génie civil.....	52
1.3.2. La biodéposition.....	54
1.3.3. Autobiocicatrisation des matériaux cimentaires.....	57
1.3.4. Exobiocicatrisation des matériaux cimentaires.....	70
1.3.5. Bilan des techniques de biocicatrisation.....	78
1.4. Modification de la rhéologie	85
1.4.1. Principes de rhéologie	85
1.4.2. Principaux types d'agents rhéologiques	88
1.4.3. Synergies entre composés	92
CHAPITRE 2. Introduction générale	96
2.1. Objectifs de la thèse	96
2.2. Démarche scientifique de la thèse	97
2.2.1. Mise en œuvre de la technique d'exobiocicatrisation	98
2.2.2. Etude de la croissance bactérienne dans le milieu d'injection	99

2.2.3. Etude du potentiel de biocicatrisation de mortiers fissurés.....	99
CHAPITRE 3. Sélection d'épaississants pour la formulation de la suspension d'injection épaissie	102
3.1. Introduction	102
3.2. Matériel et méthodes.....	103
3.2.1. Suspensions épaissies étudiées.....	103
3.2.2. Caractérisation rhéologique des suspensions épaissies.....	105
3.2.3. Essais de moussage des suspensions épaissies	106
3.3. Résultats et discussion	107
3.3.1. Présélection des épaississants	107
3.3.2. Essais de préparation de formulations	114
CHAPITRE 4. Formulation et caractérisation rhéologique de la suspension d'injection épaissie	122
4.1. Introduction	122
4.2. Matériel et méthodes.....	123
4.2.1. Caractérisation rhéologique des suspensions testées	123
4.2.2. Préparation des éprouvettes de mortier fissurées	126
4.2.3. Essais d'injection des suspensions dans des éprouvettes fissurées.....	128
4.2.4. Etude de la microstructure du dépôt d'injection dans la fissure	131
4.3. Résultats et discussion	133
4.3.1. Caractérisation rhéologique des suspensions testées	133
4.3.2. Injection du mélange Welan-Attagel.....	141
4.3.3. Etude de la microstructure du dépôt d'injection.....	146
4.4. Conclusion.....	152
CHAPITRE 5. Etude de la croissance bactérienne en milieu épaissi	153
5.1. Introduction	153
5.2. Matériel et méthodes.....	154
5.2.1. Mise en œuvre des essais de croissance bactérienne.....	154
5.2.2. Milieux de culture utilisés.....	156
5.2.3. Optimisation des conditions de culture bactérienne.....	157
5.3. Résultats et interprétation	159
5.3.1. Effet des épaississants sur la croissance bactérienne	159
5.3.2. Effet du gluconate de calcium sur la croissance bactérienne	168

5.3.3.	Optimisation de l'inoculum bactérien	174
5.3.4.	Effet d'un inoculum concentré sur la croissance bactérienne	177
5.3.5.	Conclusion des essais de croissance bactérienne	182
CHAPITRE 6.	Essais de biocicatrisation de mortiers fissurés	184
6.1.	<i>Introduction</i>	<i>184</i>
6.2.	<i>Matériel et méthodes.....</i>	<i>185</i>
6.2.1.	Préparation des éprouvettes de mortier fissurés	185
6.2.2.	Mesure de l'ouverture des fissures	186
6.2.3.	Préparation des essais de biocicatrisation	188
6.2.4.	Conduite des essais de biocicatrisation	190
6.2.5.	Analyse des essais de biocicatrisation	192
6.2.6.	Conduite des essais en milieu extérieur	193
6.3.	<i>Résultats et interprétation</i>	<i>195</i>
6.3.1.	Impact du milieu épaissi sur la perméabilité à l'air des fissures.....	195
6.3.2.	Biocicatrisation après 4 semaines de traitement	196
6.3.3.	Biocicatrisation après 16 semaines de traitement	202
6.3.4.	Essais de biocicatrisation <i>in situ</i>	221
CHAPITRE 7.	Essais de biocicatrisation à l'échelle pilote	237
7.1.	<i>Introduction</i>	<i>237</i>
7.2.	<i>Matériel et méthodes.....</i>	<i>237</i>
7.3.	<i>Résultats et discussion</i>	<i>242</i>
7.3.1.	Suivi de l'essai de biocicatrisation	242
7.3.2.	Analyse du dépôt d'injection	245
7.4.	<i>Conclusion.....</i>	<i>249</i>
CHAPITRE 8.	Conclusions et perspectives	251
8.1.	<i>Formulation d'un milieu épaissi.....</i>	<i>252</i>
8.2.	<i>Croissance bactérienne en milieu épaissi.....</i>	<i>253</i>
8.3.	<i>Essais de biocicatrisation.....</i>	<i>254</i>
8.4.	<i>Perspectives de travail futures</i>	<i>257</i>
CHAPITRE 9.	Annexes	260
	Références bibliographiques.....	266

Index des illustrations

Figure 1 : Ports d'injection le long d'une fissure (Source : EFBS Building Materials)	17
Figure 2 : Injection d'époxy au moyen d'un injecteur de surface (source : Sika)	18
Figure 3 : Application de résine au moyen d'un pistolet (Source : Sika)	18
Figure 4 : Mécanismes impliqués dans l'autocicatrisation naturelle d'une fissure. (a) : formation de carbonate ou d'hydroxyde de calcium ; (b) : particules bloquées dans la fissure ; (c) : hydratation de grains de ciment anhydres ; (d) : expansion de la pâte de ciment [22].	20
Figure 5 : Représentation schématique de l'autocicatrisation par hydratation secondaire du ciment et carbonatation [23].	20
Figure 6 : Gel de CSH et ettringite formés au sein d'une fissure [25].	22
Figure 7 : Produits d'autocicatrisation naturelle dus à l'hydratation du ciment [24].	23
Figure 8 : Formation de calcite et d'ettringite au sein de fissures autocicatrisées par une cure humide (23°C, 100 % HR) [5].	24
Figure 9 : Fibre de poly(alcool vinylique) (PVA) pontant une fissure de béton autocicatrisé, observée au MEB [31].	25
Figure 10 : Autocicatrisation naturelle de fissures en cycles d'immersion-séchage ou immergées en continu [38].	27
Figure 11 : Efflorescences de CaCO_3 sur un mur de béton fissuré (crédit : Visible Light Pictures 2016).	28
Figure 12 : Evolution de l'ouverture apparente de fissures de mortier soumis à une autocicatrisation naturelle [43].	29
Figure 13 : Système d'autocicatrisation par capsules [47].	32
Figure 14 : Impact de l'introduction de microcapsules de silicate de sodium sur l'autocicatrisation et les propriétés mécaniques de bétons [51].	33
Figure 15 : Vue en coupe d'un béton fissuré contenant des tubes de 2 mm de section contenant de la mousse de polyuréthane [52].	34
Figure 16 : Système de béton à cœur poreux [55].	35
Figure 17 : Fermeture d'une fissure par activation de fibres rétractiles [56].	35
Figure 18 : Mécanisme de formation de CaCO_3 par biominéralisation induite [62].	38
Figure 19 : Formation (A) et accumulation (B et C) de CaCO_3 autour de la cellule suite à la consommation d'urée, et « empreintes » des bactéries dans la couche de biocalcite (D) [4].	39
Figure 20 : Processus de biominéralisation de CaCO_3 par les cyanobactéries [68].	40
Figure 21 : Désamination bactérienne des acides aminés [43].	41
Figure 22 : Cycle de vie d'un biofilm sur une interface liquide/solide [75].	44
Figure 23 : Interactions chimiques entre les ions métalliques et les groupements fonctionnels des EPS au sein du biofilm [78].	46
Figure 24 : Biominéralisation induite par la dégradation des EPS [57].	47
Figure 25 : Biominéralisation induite par réorganisation des EPS [57].	47
Figure 26 : Clichés par MEB de cristaux de carbonate de calcium sous différentes morphologies (ACC : carbonate de calcium amorphe) [71].	49
Figure 27 : A– Sphérulites de biocalcite [87]. B – cristaux triradiés de biocalcite [85]. C – cristaux rhomboédriques creux de biocalcite [85].	51

Figure 28 : Amas de carbonate de calcium biosourcé, formé par agrégation de nanoparticules de carbonate de calcium amorphe [86].	51
Figure 29 : A – Cristaux de calcite présentant des empreintes de bactéries. B – Bactéries émergeant du cristal en formation [58].	52
Figure 30 : Observations au MEB. A – Couche de calcite présentant des empreintes de bactéries (flèche) [90]. B - Cristaux de calcite surmontés de bactéries, présentant des empreintes de bactéries (flèche) [89].	52
Figure 31 : Proposition de différentes méthodes pour l'entretien d'ouvrages de pierre par biodéposition de calcite [92].	55
Figure 32 : Procédé de biodéposition par brossage de suspensions bactériennes semi-solides [101].	56
Figure 33 : Réduction de la capacité d'absorption de l'eau de GBR par biodéposition de calcite, pour des mortiers de rapport E/C et de granulométries différentes [102].	57
Figure 34 : Evolution du nombre de bactéries viables dans le matériau au cours du temps [103].	58
Figure 35 : Impact de l'introduction de 0,5 % de différents précurseurs carbonatés sur la résistance du mortier à la traction [107].	60
Figure 36 : Empreintes sphériques des microcapsules brisées dans un mortier fissuré [114].	61
Figure 37 : Réduction de surface d'ouverture de fissures. R – contrôle ; N – nutriments seulement ; C – capsules de mélamine ; NC – capsules et nutriments ; NCS – 3% ou 5% de capsules contenant des bactéries, avec nutriments ; wd – cycles de mouillage-séchage.	62
Figure 38 : Capsules d'alginate contenant des bactéries, recouvertes d'une couche de calcite biosourcée, observées au MEB [115].	63
Figure 39 : Surface d'une bille de Ceramsite avant (A) et après (B) imprégnation dans une culture bactérienne [122].	65
Figure 40 : Résistance en compression à 28 jours sur des mortiers à base de ciment classique, selon la technique d'autobiocicatrisation employée [123].	66
Figure 41 : Colmatage de fissures par deux souches bactériennes immobilisées sur charbon actif (GAC) ou sur des particules d'argile expansée (EC) [72].	67
Figure 42 : Regain de résistance (à gauche) et réduction de perméabilité (à droite) de mortiers fissurés contenant des tubes d'eau (R), du silicagel (SG) ou de la mousse polyuréthane (PU), avec ou sans bactéries (BS) [126].	69
Figure 43 : Poutre de béton à cœur poreux fissurée, et suspension bactérienne en cours d'injection (figurée en vert) [90].	72
Figure 44 : Colmatage de surface de mortiers poreux (PNC) par exobiocicatrisation. Photos a et b : après 28 jours de cure sèche ; c et d : après 28 jours de cure humide [90].	72
Figure 45 : Observations au MEB d'une fissure de mortier avant (à gauche) et après (au centre) biominéralisation ; à droite, observation à fort grossissement du dépôt sur une microfissure.	73
Figure 46 : Micrographie au MEB de <i>B. pasteurii</i> immobilisées dans de la mousse polyuréthane [89].	74
Figure 47 : Micrographie d'une bille de verre poreux contenant des bactéries [134].	75
Figure 48 : Regain de résistance en compression d'échantillons biocicatrisés à l'aide de billes de verre [134].	75
Figure 49 : Perméabilité à l'eau d'échantillons fissurés suite à différents traitements de biocicatrisation [137]. Les essais notés BS correspondent aux essais incluant des bactéries.	77
Figure 50 : Comportement des différents types de fluides.	87

Figure 51 : Comportements rhéopexe et thixotrope de fluides lors d'un cisaillement constant (1) suivi d'une période de repos (2).	88
Figure 52 : Effet rhéofluidifiant des suspensions de macromolécules [142].	88
Figure 53 : réaction de gélification de l'alginate de sodium [145].	91
Figure 54 : Micro-agrégat comprenant des plaquettes d'argile (flèches noires), des EPS (flèche blanche épaisse), et une bactérie Gram-négative (B) fixée au substrat (flèche noire épaisse) [159].	94
Figure 55 : Modification de la structure de la smectite par le développement du biofilm bactérien [161].	95
Figure 56 : Conditions d'application de l'exobiocatisation selon l'échelle considérée (en laboratoire/in situ).	97
Figure 57 : Etapes scientifiques de la thèse.....	101
Figure 58 : Déroulement du programme de mesure de la rhéologie.	106
Figure 59: Rhéogrammes en décélération des suspensions des différents épaississants présélectionnés. A – Contrainte de cisaillement ; B – Viscosité.....	110
Figure 60 : Rhéogramme des suspensions de Methocel utilisées comme références pour les essais d'injection.....	113
Figure 61: Rhéogrammes des suspensions d'Attagel avec du Xanthane ou du Welan, seuls ou en mélange. A – Contrainte de cisaillement ; B – Viscosité.	117
Figure 62 : Rhéogramme en décélération de la suspension contenant 0,4 % de Welan et 6 % d'Attagel (WA46) avec et sans ajout de 0,5% de BSA.	120
Figure 63 : Suspensions contenant 0.4 % de Welan et 6 % d'Attagel, piégées entre deux lames de microscopie. A gauche : sans ajout de BSA (WA46), à droite : avec 0,5 % de BSA (WA46 B5).	120
Figure 64 : Déroulement du programme de mesure de la rhéologie pour la caractérisation du mélange Welan-Attagel.	124
Figure 65 : Déroulement du programme de mesure de la thixotropie.	125
Figure 66 : Moule destiné à la fabrication des éprouvettes de mortier [26].	127
Figure 67 : Système de fissuration des éprouvettes : à gauche, éprouvette seule ; au milieu, les pièces du cœur expansif ; à droite, le cœur expansif assemblé dans l'éprouvette [23].	127
Figure 68 : Représentation schématique d'une éprouvette : à gauche, avant fissuration ; à droite, fissurée avec le coeur expansif [23].	128
Figure 69 : A gauche – pièces de l'injecteur. A droite – système d'injection installé sur une éprouvette de mortier.	129
Figure 70: Fissure colmatée par un adhésif aluminium, après injection d'une suspension colorée.	130
Figure 71: Découpe, ouverture et traitement numérique des fissures ayant subi une injection avec colorant.	131
Figure 72: Schéma de découpe d'une éprouvette fissurée pour observation au MEB.	132
Figure 73 : Rhéogrammes des mélanges WA caractérisés.	134
Figure 74 : Surface de réponse des suspensions en fonction des concentrations en Attagel et en Welan aux taux de cisaillement de 0,1, 100 et 500 s ⁻¹	135
Figure 75 : Propriétés des différentes suspensions suivant la loi d'Ostwald, désignées par leurs identifiants respectifs.	137
Figure 76 : Chute de viscosité apparente entre 0.1 s ⁻¹ et 500s ⁻¹ en fonction de la teneur en Welan et en Attagel des suspensions.	137

Figure 77: A– Taux et contrainte de cisaillement d'une suspension WA 36 en fonction du temps. B – Contrainte de cisaillement de WA 36 en fonction du taux de cisaillement, complet ou limité au dernier point de chaque palier.	139
Figure 78 : Mesure de la thixotropie de la suspension WA36 pendant 10 minutes.	140
Figure 79: Coloration d'une fissure d'ouverture 157 μm après injection d'une suspension de Methocel à 0,6 %. Le côté droit correspond à la face extérieure de l'éprouvette.	143
Figure 80 : Observation d'une fissure après injection et séchage de la suspension WA36 colorée au bleu de méthylène.	144
Figure 81 : Observation d'une fissure après injection et séchage de la suspension WA36 sans colorant.	144
Figure 82: Vitesses d'évaporation du milieu non épaissi et d'une suspension de WA36 (0,3 % de Welan et 6 % d'Attigel).....	145
Figure 83 : Observation au MEB d'une section polie d'une fissure après injection de la suspension WA36.	147
Figure 84 : Observation au MEB du dépôt d'injection sur la surface interne d'une fissure après injection de la suspension WA36. Flèche : crête de dépôt d'injection.	147
Figure 85 : Section polie d'une fissure observée au MEB après injection et séchage de la suspension WA36, et analyse EDS de la zone encadrée en noir (dépôt d'injection).	149
Figure 86 : Observations au MEB du dépôt d'injection après injection de la suspension WA36. A - tapis d'argiles et cristaux non identifiés ; B - cristal de dolomite partiellement recouvert d'argiles ; C et D – surfaces couvertes avec particules non identifiées.	150
Figure 87 : Observations au MEB de la couche d'autocicatrisation du mortier à différents grossissements.	151
Figure 88 : Observations au MEB de la couche d'autocicatrisation (b) et du dépôt d'injection (a) recouvrant partiellement la matrice cimentaire (c).	151
Figure 89 : Organigramme des différents essais de croissance bactérienne réalisés.	158
Figure 90: Micrographies de cultures de <i>B. pseudofirmus</i> colorées à l'acridine orange.	160
Figure 91 : Cinétique de croissance bactérienne en milieu NBN, selon la morphologie adoptée.	160
Figure 92 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieux LN et LNW à 30°C.	161
Figure 93: Bactéries (bacilles et tétrades, points jaunes et filaments rouges) dans un amas (en vert) d'épaississants (Welan-Attigel) après 35 jours de culture.	163
Figure 94 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LN à 20°C. En pointillés : suivi à 30°C (données de l'essai précédent).	165
Figure 95 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LN à 20°C. En pointillés: suivi à 30°C (données de l'essai précédent).	166
Figure 96 : Bilan de la production de carbonate de calcium au cours des essais de croissance bactérienne.	168
Figure 97 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LNG à 30°C, comparaison avec les résultats obtenus en milieu LN à 30°C.	169
Figure 98 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LNG à 30°C, comparaison avec les résultats obtenus en milieu LNGW à 30°C.	170
Figure 99 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LNG, à 20°C, comparaison avec les résultats obtenus en milieu LN à 20°C.	171
Figure 100 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieux LNG et LNGW, à 20°C.	172
Figure 101 : Bilan de la production de carbonate de calcium au cours des essais de croissance bactérienne.	173
Figure 102 : Croissance bactérienne dans la préculture NBN inoculée à partir de cryotubes préparés en milieu NBN.	175

Figure 103 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieux LNG et LNGW à 20°C, depuis une préculture LNG concentrée.	178
Figure 104 : Suivi d'essai de croissance en milieu LNG à 20°C, depuis une préculture NBN optimisée et concentrée.	180
Figure 105 : Bilan de la production de carbonate de calcium au cours des essais de croissance bactérienne.	182
Figure 106 : Dispositif de mesure de la perméabilité à l'air.	186
Figure 107 : Relation entre le débit d'air sortant et l'ouverture superficielle des fissures étudiées, à 0,2 et 0,5 bar.	187
Figure 109 : Réduction d'ouverture apparente après chaque injection de milieu LNGW.A – données moyennes pour 6 échantillons ; B – mesures individuelles des échantillons.	196
Figure 110 : Observation au MEB du dépôt d'injection après 1 mois de traitement in vitro en présence de bactéries, échantillon P1. Flèches : bactéries.	198
Figure 111 : Observation au MEB du dépôt d'injection de l'échantillon P1 après 1 mois de traitement in vitro en présence de bactéries, ciblant un sphérulite.	199
Figure 112 : Observation au MEB de la section polie de l'échantillon P1 après 4 semaines de biocicatrisation in vitro. Carré : zone sélectionnée pour la conduite d'analyses EDS.	200
Figure 113 : Analyses EDS de différents points d'une crête de dépôt d'injection, échantillon P1 après quatre semaines de biocicatrisation in vitro.	201
Figure 114 : Surface de l'échantillon T2 (témoin stérile), après 16 semaines de traitement.	203
Figure 115 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein de l'échantillon T2 après 4 mois de traitement in vitro.	204
Figure 116 : Observation au MEB de la section polie de l'échantillon T2 après 4 mois de traitement in vitro.	205
Figure 117 : Réduction des ouvertures apparentes des séries témoin et inoculées, après 4 mois de traitement.	207
Figure 118 : Ouverture apparente des éprouvettes à la fin du traitement de biocicatrisation, puis après les tests de résistance à la pression et au lessivage.	208
Figure 119 : Photographie de la surface supérieure de l'échantillon P3, après 4 mois de traitement.	209
Figure 120 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon P2 après 4 mois de traitement in vitro. Flèches pleines : bactéries et biofilm – flèches creuses : empreintes bactériennes dans le CaCO ₃	211
Figure 121 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon C3, après 4 mois de traitement in vitro. Flèches pleines : bactéries – flèches creuses : empreintes bactériennes dans le CaCO ₃	212
Figure 122 : Observation au MEB d'un sphérulite de carbonate de calcium au sein du dépôt d'injection dans l'échantillon C3, après 4 mois de traitement in vitro.	213
Figure 123 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement, à l'embouchure de la fissure.	214
Figure 124 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement (agrandissement de la zone encadrée n°1 de la Figure 123). Entouré : position des points de mesure par EDS.	215
Figure 125 : Composition déterminée par EDS des points de mesure indiqués sur la Figure 124.	215
Figure 126 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement (agrandissement de la zone encadrée n°2 de la Figure 123). Entouré : position des points de mesure par EDS.	216
Figure 127 : Composition déterminée par EDS des points de mesure indiqués sur la Figure 126.	217

Figure 128 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement, à l'intérieur de la fissure. Entouré : position des points de mesure par EDS.	218
Figure 129 : Composition déterminée par EDS des points de mesure indiqués sur la Figure 128.	218
Figure 130 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement, à l'intérieur de la fissure. Formation de carbonate de calcium (a) à la surface du dépôt d'injection (b).	219
Figure 131 : Evolution de l'ouverture apparente des échantillons non inoculés par la bactérie d'étude au cours du traitement de biocicatrisation in situ.....	223
Figure 132 : Photographie de l'échantillon Inoc-2 après 4 mois de traitement in situ.....	223
Figure 133 : Evolution de l'ouverture apparente des échantillons inoculés au cours du traitement de biocicatrisation in situ	224
Figure 134 : Réduction d'ouverture apparente (A) et taux de colmatage (B) des fissures étudiées après 21 semaines de traitement in situ de mortiers fissurés.....	225
Figure 135 : Ouverture apparente des éprouvettes à la fin du traitement de biocicatrisation, puis après les tests de résistance à la pression et au lessivage.	227
Figure 136 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ, cliché à faible grossissement.	228
Figure 137 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ. A – zone de dépôt d'injection vierge ; B – zone recouverte de biofilm.	229
Figure 138 : Observation au MEB de l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ : détail de la couche d'autocicatrisation.	230
Figure 139 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ. a – couche d'autocicatrisation ; b – zone interfaciale ; c – CaCO_3 lié au dépôt d'injection ; d – dépôt d'injection.....	232
Figure 140 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2, zone de dépôt recouverte de biofilm.	232
Figure 141 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2. A – zone de dépôt recouverte de biofilm et d'amas de CaCO_3 ; B – agrandissement de la zone encadrée. Flèches : empreintes bactériennes dans un amas de CaCO_3	233
Figure 142 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2. Flèches : empreintes bactériennes dans un amas de CaCO_3	234
Figure 143 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2. A – zone recouverte de biofilm et d'amas de CaCO_3 ; B – cellules plasmolysées intégrées au biofilm.	235
Figure 144 : Photographie et représentation en 3D de la dalle de béton sur le cadre de traction.....	238
Figure 145 : Détail du dispositif de traction. De droite à gauche : verrouillage de base, avec adaptateur pour rallonge, avec chaise d'acier (en bleu) et adaptateur.....	238
Figure 146 : Sabot d'injection mis en place sur la dalle fissurée à l'aide de scellant polyuréthane.	239
Figure 147 : Protocole schématisé de l'essai de biocicatrisation à l'échelle pilote.....	241
Figure 148 : Dispositif de mesure de la perméabilité à l'eau de la dalle. 1 - éprouvette graduée ; 2 - vanne ; 3 - réserve ; 4 - vanne ; 5 - socle étanche ; 6 - joint ; 7 - dalle fissurée.	242
Figure 149 : Carotte de la fissure de référence à l'issue de l'essai de biocicatrisation à l'échelle pilote.Flèche : sens d'injection.	245
Figure 150 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein d'un échantillon de référence après traitement dans une dalle fissurée.....	246

<i>Figure 151 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein d'un échantillon inoculé après traitement dans une dalle fissurée. A – détail du dépôt d'injection ; B – zone de dépôt avec empreintes bactériennes.....</i>	<i>247</i>
<i>Figure 152 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein d'un échantillon inoculé après traitement dans une dalle fissurée. Flèche : bactéries enveloppées de CaCO₃.</i>	<i>248</i>
<i>Figure 153 : Potentielles voies de décomposition du lactate de calcium.</i>	<i>260</i>
<i>Figure 154 : A – Pics du lactate et du gluconate en début de culture ; B – Présence de pics parasites multiples en cours d'essai ; C – Pollution du gluconate par un pic parasite.</i>	<i>261</i>
<i>Figure 154 : Courbe d'ATG de suspensions LNW stériles après centrifugation, rinçage et séchage.</i>	<i>263</i>
<i>Figure 156 : ATG d'un essai de croissance à 20°C en milieu LNG et LNGW, depuis un inoculum concentré.</i>	<i>264</i>

Index des tableaux

Tableau 1 : Composition et propriétés majeures des EPS [59].	45
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes techniques de biocicatrisation.	78
Tableau 3 : Potentiel de biocicatrisation d'un béton contenant 5 % de capsules de 10 μm selon le précurseur de biominéralisation, pour une calcite de densité de 1,8 (max) ou 2,7 mg/mm^3 (min).	81
Tableau 4 : Potentiel de biocicatrisation de solutions saturées en différents précurseurs de biominéralisation, pour une calcite de densité de 2.3 (max) ou 2.7 mg/mm^3 (min).	82
Tableau 5 : Nature et propriétés des épaississants étudiés.	103
Tableau 6 : Chute de viscosité entre 0,1 et 100 s^{-1} des suspensions étudiées.	111
Tableau 7 : Paramètres rhéologiques des suspensions présélectionnées selon le modèle d'Ostwald.	111
Tableau 8 : Principales propriétés rhéologiques des mélanges biopolymère-Attagel testés.	114
Tableau 9 : Paramètres rhéologiques des mélanges sélectionnés selon le modèle d'Ostwald.	118
Tableau 10 : Matrice de Hadamard pour l'étude des suspensions Welan-Attagel.	125
Tableau 11 : Plan d'expérience composite pour l'étude des suspensions Welan-Attagel.	125
Tableau 12 : composition en oxydes du ciment utilisé.	126
Tableau 13 : composition minéralogique du ciment étudié.	126
Tableau 14 : Observations réalisées sur les suspensions WA préparées d'après la matrice de Hadamard.	133
Tableau 15 : Caractéristiques rhéologiques des suspensions de Welan-Attagel selon la loi d'Ostwald.	138
Tableau 16 : Plages d'utilisation approximatives des suspensions de Welan-Attagel réalisées.	142
Tableau 17 : Plages d'utilisation des suspensions de Methocel d'après les essais réalisés.	142
Tableau 18: Composition du dépôt d'injection de la suspension WA36 mesurée par EDS et composition théorique de la poudre d'Attagel [184].	148
Tableau 19 : Milieux utilisés pour les essais de croissance bactérienne.	156
Tableau 20 : Concentrations et potentiel de production de carbonate de calcium pour chacun des précurseurs et des milieux étudiés.	157
Tableau 21 : Production de matière sèche et de carbonate de calcium en milieux LN et LNW à 30°C.	162
Tableau 22 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieu LN à 20°C.	164
Tableau 23 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieu LNW à 20°C.	167
Tableau 24 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 30°C.	169
Tableau 25 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 20°C.	171
Tableau 26 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 20°C, depuis une préculture LNG concentrée.	179
Tableau 27 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 20°C, depuis une préculture NBN concentrée.	181
Tableau 28 : Paramètres utilisés pour le calcul de l'ouverture apparente à 0,2 et 0,5 bar.	187
Tableau 29 : Etapes suivies lors des essais de biocicatrisation in vitro.	191
Tableau 30 : Etapes suivies lors des essais de biocicatrisation in situ.	194

<i>Tableau 31 : Impact de l'injection de la suspension LNGW sur l'ouverture apparente (OA) de mortiers fissurés.</i>	<i>195</i>
<i>Tableau 32 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 4 semaines de traitement pour des mortiers fissurés inoculés ponctuellement (série P) ou en continu (série C).</i>	<i>197</i>
<i>Tableau 33 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 16 semaines de traitement pour des mortiers fissurés témoins (série T), inoculés ponctuellement (série P) ou en continu (série C).</i>	<i>203</i>
<i>Tableau 34 : Analyse par EDS du dépôt d'injection au sein de l'échantillon T2 après 16 semaines de traitement in vitro.</i>	<i>205</i>
<i>Tableau 35 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 21 semaines de traitement in situ pour des mortiers fissurés non inoculés par la bactérie d'étude.....</i>	<i>222</i>
<i>Tableau 36 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 21 semaines de traitement in situ pour des mortiers fissurés inoculés.</i>	<i>224</i>
<i>Tableau 37 : Suivi de la perméabilité à l'eau des fissures au cours de l'essai de biocicatrisation à l'échelle pilote.</i>	<i>243</i>
<i>Tableau 38 : Détermination de la teneur en CaCO₃ initiale du milieu LNW.</i>	<i>263</i>

Index des abréviations

ATG : Analyse Thermo-Gravimétrique

BSA : Bovine Serum Albumine (albumine de sérum bovin).

DBO : Demande Biologique en Oxygène.

DO : Densité Optique.

DRX : Analyse par Diffraction à Rayons X.

EDS : Energy Dispersive Spectroscopy (spectroscopie X à dispersion d'énergie).

EDTA : Acide Ethylène Di-amine Tétracétique.

EPS : Extracellular Polymeric Substances (substances polymériques extracellulaires).

FTIR : Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier.

GBR : Granulats de Béton Recyclés.

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy.

MAS : Magnésium-Aluminium-Silicate. Désigne l'ensemble des argiles principalement composées de ces trois éléments.

MCP : Microbial Carbonate Precipitation.

MEB : Microscopie Electronique à Balayage.

MICP : Microbially-Induced Carbonate Precipitation.

NB : Nutrient Broth, ou milieu NB à base de Nutrient Broth.

OA : Ouverture Apparente (d'une fissure)

OPC : Ordinary Portland Cement (Ciment Portland Ordinaire).

PU : Polyuréthane.

SRB : Sulphate-Reducing Bacteria (bactéries sulfo-réductrices).

WA : Welan-Attagel (en suspension)

Introduction

La biominéralisation, ou la production de minéraux par des êtres vivants, est un phénomène très répandu dans la nature : le squelette, les coquillages, les carapaces de crustacés mais aussi certaines formations géologiques sont le résultat de la biominéralisation. Afin de répondre aux défis technologiques actuels et de créer de nouveaux matériaux respectueux de l'environnement, de plus en plus de travaux visent à utiliser la biominéralisation dans des domaines spécifiques comme la médecine ou l'industrie. En effet, certaines bactéries ont la faculté de produire des cristaux de carbonate de calcium lorsqu'elles se développent dans un milieu riche en ions calcium. Or, le carbonate de calcium, en particulier sous la forme de calcite, est un matériau aux propriétés intéressantes pouvant être utilisé pour l'entretien des ouvrages en matériaux cimentaires, en particulier le béton.

En effet, tous ces ouvrages en matériaux cimentaires sont soumis à la formation de fissures, se multipliant continuellement avec le temps. Si un réseau important de fissures peut fragiliser un ouvrage, les fissures sont en premier lieu de véritables plaies ouvertes : même les fissures les plus fines accélèrent le vieillissement du matériau de manière très importante, en permettant l'ingression de composés agressifs à l'intérieur même de la structure. En effet, l'eau et l'air sont vecteurs d'une grande variété de composés qui dégradent ou favorisent l'altération de la matrice cimentaire, et qui provoquent la corrosion des barres d'armatures en acier. Cette altération contribue à élargir le réseau de fissures, ce qui se traduit par une réduction importante de la durabilité du matériau. En outre, certains ouvrages comme les barrages, les sous-sols ou les réservoirs ne peuvent plus remplir correctement leur rôle s'ils sont fissurés. La réparation des ouvrages fissurés est donc une nécessité.

Les fissures larges (de taille supérieure à 1 mm) peuvent être réparées à l'aide de mortiers, mais les microfissures requièrent l'usage de composés synthétiques comme les résines époxy ou la mousse polyuréthane. Ces composés permettent un regain d'une partie des performances mécaniques et sont très imperméables, mais sont loin d'être idéaux : leur fabrication et leur utilisation sont polluantes, impliquent des composés toxiques, et ces molécules se dégradent avec le temps, ce qui impose de renouveler la réparation au bout d'une dizaine d'années [1], [2]. L'entretien des ouvrages fissurés représente donc une dépense d'argent importante ainsi qu'une forte pollution. Il est par conséquent nécessaire de développer des méthodes de réparation alternatives plus durables et plus respectueuses de l'environnement, telles que la formation de carbonate de calcium par biominéralisation.

Le carbonate de calcium et en particulier la calcite est un matériau de réparation très intéressant : d'une composition proche des matériaux cimentaires, elle y adhère et se comporte de la même manière, évitant les incompatibilités entre le matériau à réparer et le matériau de réparation. Bien qu'elle puisse être d'une couleur différente de l'ouvrage, la calcite est aussi un matériau plus esthétique que les polymères. Enfin, ce minéral se dégrade beaucoup plus lentement que les polymères synthétiques, réduisant d'autant la fréquence de réparation. Il est impossible d'injecter de la calcite comme l'on injecterait une résine, mais la biominéralisation permet de former de la calcite au sein même de la fissure, pour une efficacité de réparation optimale. Les bactéries n'utilisant que des nutriments et du calcium pour prospérer, cette méthode s'affranchit de tout composé toxique, ce qui la rend particulièrement respectueuse de l'environnement.

Ce projet fait suite à plusieurs travaux qui étudient la possibilité d'utiliser des bactéries pour cicatrifier les fissures des matériaux cimentaires : de nombreuses études ont prouvé que des bactéries sélectionnées sont capables de déposer une couche de calcite à l'intérieur de la fissure quand elles y sont cultivées en présence de calcium, et ce malgré l'alcalinité très forte des matériaux cimentaires [3], [4]. Il existe deux concepts différents de mise en œuvre de la biominéralisation dans le génie civil : l'introduction de bactéries lors de la fabrication du matériau cimentaire, afin de lui conférer une capacité d'autobiocicatrisation, et l'injection de bactéries dans des fissures déjà existantes pour réaliser l'exobiocicatrisation.

Doter les ouvrages d'une capacité d'autobiocicatrisation est une méthode préventive permettant de réparer des fissures pouvant être inaccessibles, voir indétectables, sans aucun besoin de diagnostic ou d'intervention. Cette méthode, actuellement la plus étudiée, n'est toutefois pas universelle : elle ne peut s'appliquer aux ouvrages qui n'ont pas été construits avec cette capacité. De plus, la forte alcalinité et la faible porosité du matériau rend difficile la survie des bactéries à long terme dans la matrice, limitant l'efficacité de la méthode à long terme. Enfin, les réserves d'agents de réparation introduites dans la structure doivent être limitées pour ne pas altérer les performances du matériau. Il restera donc toujours un besoin de maintenance externe des ouvrages. Cette maintenance externe peut être réalisée par les mêmes bactéries, en utilisant un procédé d'exobiocicatrisation.

La démonstration de ce potentiel en conditions contrôlées chez *Bacillus pseudofirmus* au cours de la thèse de Ducasse-Lapeyrusse [5] a motivé ce projet. En effet, les travaux précédemment réalisés ont conduit au choix d'une souche bactérienne et à la conception d'un milieu de culture adaptés pour la biocicatrisation, permettant le colmatage à plus de 75 % de fissures de 200 µm d'ouverture. La

méthode utilisée, qui repose sur l'immersion des mortiers dans la suspension bactérienne, doit néanmoins être adaptée pour une utilisation en conditions réelles.

Sur la base des essais de biocicatrisation qui ont été réalisés, l'objectif de cette thèse est de créer une technique de biocicatrisation utilisant *Bacillus pseudofirmus* dans un milieu enrichi en lactate de calcium qui soit adaptée aux contraintes d'une utilisation en conditions réelles. Pour accomplir cet objectif, une suspension épaissie est préparée à l'aide d'épaississants sélectionnés pour leur caractère rhéofluidifiant et thixotropique, et ses propriétés rhéologiques sont caractérisées. Les épaississants sélectionnés permettent de réaliser efficacement l'injection de la suspension bactérienne dans des fissures d'ouverture comprise entre 150 et 500 μm , et d'assurer le maintien des bactéries et du milieu nutritif dans la fissure après l'injection. Afin d'assurer une production maximale de CaCO_3 dans les fissures lors du traitement de biocicatrisation, le potentiel de biominéralisation de la souche d'étude *B. pseudofirmus* dans la suspension épaissie est évalué et optimisé au cours d'essais de croissance bactérienne réalisés dans des conditions de culture optimales. L'optimisation de la suspension bactérienne au niveau rhéologique et biologique permet de réaliser des essais de biocicatrisation consistant à colmater des fissures réalistes carbonatées d'ouverture comprise entre 150 μm et 500 μm . Réalisés dans un premier temps en conditions contrôlées, puis *in situ* et enfin à l'échelle pilote, ces essais de biocicatrisation ont pour objectif d'évaluer le potentiel de la méthode d'exobiocicatrisation mise au point au cours de cette thèse, autour de trois axes : la mise en œuvre pratique, le potentiel de colmatage et l'applicabilité en conditions réelles.

CHAPITRE 1.

Etat de l'Art

1.1. Les matériaux cimentaires

Les matériaux cimentaires sont aujourd'hui les principaux matériaux de construction dans le monde. Ils sont représentés en premier lieu par les ouvrages en béton, matériau le plus consommé après l'eau. Les matériaux cimentaires sont constitués principalement :

- D'un liant, le ciment, dont la taille des grains est comprise entre 3 et 100 μm ;
- D'eau ;
- De granulats. Les mortiers, qui ne contiennent que du sable (granulats de diamètre inférieur à 5 mm) se distinguent des bétons qui contiennent également des gravillons (granulats de diamètre supérieur à 2 mm) [6].

Des barres d'armatures en acier sont incluses dans la structure de la plupart des ouvrages pour la renforcer. Une fois la pâte de ciment durcie, on obtient donc un matériau solide mêlant le liant durci, les granulats, les barres d'armature et de l'air. Les matériaux cimentaires peuvent être très complexes et diversifiés malgré leur base commune : leurs teneurs en liant, en eau et en granulats peuvent être adaptées en fonction des usages du matériau, et ceux-ci contiennent parfois des ajouts et des additifs variés. Une particularité du béton est qu'il s'agit d'un matériau poreux, ce qui fait des matériaux cimentaires des matériaux perméables. Ils sont donc soumis aux agressions du milieu extérieur non seulement en surface mais aussi en profondeur, et seront d'autant plus sensibles que cette perméabilité sera importante [7].

Les matériaux cimentaires sont soumis à une variété d'agressions extérieures réduisant leur durée de vie. Du fait du retrait des matériaux cimentaires lors du durcissement et de leur séchage, de leur faible élasticité et résistance en tension, ils sont le siège de la formation de fissures tout au long de leur durée de vie [8]. Dans le cas des bétons armés, la formation de fissures à jeune âge est quasi-inévitable et n'est considérée comme néfaste qu'à partir d'un certain niveau, c'est pourquoi les codes de conception des ouvrages acceptent souvent des fissures allant jusqu'à 300 μm d'ouverture [9], [10]. Les déformations du béton à très jeune âge, comme le retrait endogène ou l'application de contraintes avant que le matériau n'ait développé une résistance suffisante pour y résister, sont en effet courants et engendrent la formation de nombreuses fissures de moins de 100 μm .

Le matériau ayant une forte capacité d'autocicatrisation à jeune âge (notamment grâce à son faible taux d'hydratation du ciment, voir section 1.1.2), un regain important voire total des propriétés mécaniques peut être obtenu au bout de quelques semaines pour des fissures de moins de 20 μm [11].

Toutefois, la multiplication et l'agrandissement des fissures dans le matériau au cours de son vieillissement peuvent avoir des effets très néfastes :

- La dépassement des barres d'armatures par les ions chlorure et le CO_2 atmosphérique, déclenchant leur corrosion. L'augmentation de volume accompagnant la corrosion de l'acier provoque la fissuration puis l'écaillage de l'ouvrage, mettant à nu les armatures et accélérant encore le processus [12] ;
- La lixiviation par l'eau des produits d'hydratation de la matrice cimentaire, les entraînant hors de l'ouvrage par les fissures. Ce phénomène, qui concerne notamment la portlandite, diminue la solidité du matériau, augmente sa perméabilité, et génère des efflorescences de calcite en surface. Ces efflorescences cicatrisent la fissure mais sont très inesthétiques [13] ;
- La sensibilisation aux cycles de gel-dégel par l'entrée d'eau, qui en se transformant en glace fissure le matériau et provoque à long terme la dégradation de l'ouvrage ;
- Les fuites diverses, lorsque l'ouvrage remplit un rôle de barrière (ouvrages souterrains, réservoirs, barrages, stockage de déchets radioactifs). Ce rôle n'est alors plus rempli, ce qui peut avoir des conséquences importantes notamment pour le stockage de substances dangereuses ou radioactives [14] ;
- La pénétration au sein des fissures de microorganismes pouvant dégrader le matériau par voie mécanique (croissance d'hyphe de champignons ou de rhizoïdes de lichens) ou chimique (excrétion de substances délétères ou utilisation du matériau comme substrat de croissance) [15], [16] ;
- L'ingression de divers composés agressifs pour le matériau, comme des acides et des sulfates, dissolvant le liant ou pouvant générer de la fissuration par expansion [17].

La fissuration du matériau réduit via ces effets la durabilité du matériau, induisant une diminution de la résistance mécanique et l'accélération de son vieillissement par l'augmentation de sa perméabilité. On distinguera deux types de fissures :

- les fissures fines, d'une largeur inférieure à 100 μm , qui permettent l'ingression de composés délétères mais qui ont peu d'impact sur la structure de l'ouvrage ;

- les fissures larges, d'une largeur supérieure à 100 μm , qui peuvent altérer la structure, en particulier si le réseau de fissures est dense. Etant soumis à tous ces processus d'altération, la plupart des ouvrages ont une durée de vie largement inférieure à 100 ans et doivent être régulièrement entretenus [18].

1.1.1. Techniques conventionnelles de réparation

Les fissures des matériaux cimentaires sont actuellement traitées selon deux principales voies : l'injection de polymère ou l'application d'un mortier de réparation. Les mortiers de réparation sont des pâtes cimentaires modifiées d'une viscosité très élevée, utilisés pour la réparation de zones entières ou de fissures très larges ($> 1 \text{ cm}$) ; ils ne concernent donc pas notre champ d'étude. Les résines, plus fluides, permettent de colmater les fissures fines. Ce sont des composés résistants et très imperméables, et diversifiés pour être adaptées à toutes les situations. Ce sont généralement des résines époxy, mais l'injection de polyuréthane est couramment utilisée. Selon le type de fissure à traiter et le type de résine utilisé, plusieurs types d'injection sont possibles : l'injection interne, l'injection de surface et l'application de surface.

L'injection interne. Cette technique consiste à forer le matériau pour injecter la résine directement au cœur du réseau de fissures, et ainsi avoir une efficacité de remplissage maximale (Figure 1). Bien qu'il soit possible d'utiliser des buses d'injection plus petites et donc plus discrètes, cette méthode est toutefois assez lourde à mettre en œuvre et très inesthétique à cause de la nécessité de forer de nombreux trous dans l'ouvrage.



Figure 1 : Ports d'injection le long d'une fissure (Source : EFBS Building Materials)

L'injection de surface. L'injection de surface consiste à adapter des ports d'injection placés à intervalles réguliers sur toute la longueur de la fissure sans la forer (Figure 2). Afin d'éviter que la

résine ne s'écoule par la fissure, un joint temporaire est appliqué sur la fissure. Celui-ci est retiré après séchage complet de la résine injectée. Cette méthode est en général employée à basse pression et elle est adaptée aux fissures fines, mais est plus susceptible de laisser des zones non traitées. Comme elle ne nécessite pas de percer l'ouvrage, elle est moins onéreuse et plus discrète que l'injection interne. Cette méthode est utilisée le plus souvent dans des endroits abrités parcourus par des réseaux de fissures fines tels que des sous-sols, en général à petite échelle (fissures de quelques mètres, caves de particuliers...).



Figure 2 : Injection d'époxy au moyen d'un injecteur de surface (source : Sika)

L'application de surface. Cette méthode consiste à appliquer la résine dans la fissure, à l'aide d'un pistolet (Figure 3). Cette méthode ne permet cependant qu'un colmatage de surface, et ne peut être employée que sur des surfaces horizontales.



Figure 3 : Application de résine au moyen d'un pistolet (Source : Sika)

Les résines sont des matériaux dont la fabrication et l'utilisation ont un fort impact environnemental : leur production est issue de ressources fossiles et nécessite l'utilisation de composés hautement toxiques pouvant contaminer des personnes ou le milieu naturel [19]. Les résines elles-mêmes présentent des risques pour les utilisateurs lors de leur application (irritation des voies respiratoires, troubles liés à l'inhalation de solvants...) [1]. De plus, le coefficient de dilatation thermique des résines est différent de celui des matériaux cimentaires : sous l'effet de variations de température, la réparation peut donc ne plus colmater efficacement la fissure, ou au contraire exercer une force d'expansion délétère pour le matériau [2]. Enfin, les agents de réparation de synthèse souffrent d'une durée de vie limitée : la résine se dégrade au cours du temps, libérant dans l'environnement des monomères qui n'ont pas réagi (Bisphénol A par exemple) et des produits de photodégradation variés (phénols, xylènes, benzènes...) [20]. Il faut généralement renouveler le traitement au bout de 10 à 15 ans [9] ; ce qui se traduit par un coût financier et un impact environnemental accrus.

1.1.2. Mécanismes d'autocicatrisation naturelle

Observée pour la première fois en 1836 [14], l'autocicatrisation naturelle du béton est un phénomène important pour le recouvrement des propriétés de perméabilité, qui implique plusieurs mécanismes simultanément, qui n'ont été compris que récemment. Comme présenté par la Figure 4, quatre mécanismes abiotiques d'autocicatrisation naturelle des matériaux cimentaires ont été identifiés [8], [21], [22] :

- l'hydratation du ciment anhydre résiduel (c) ;
- la déposition de composés dissous, résultat de deux mécanismes : la carbonatation de Ca(OH)_2 dissous en carbonate de calcium, et la déposition de calcite ou de portlandite (a) ;
- le gonflement de la pâte de ciment hydratée (du gel de C-S-H) (d) ;
- le colmatage des fissures par des particules en suspension (issues du milieu extérieur ou débris issus de l'ouverture de la fissure) (b).

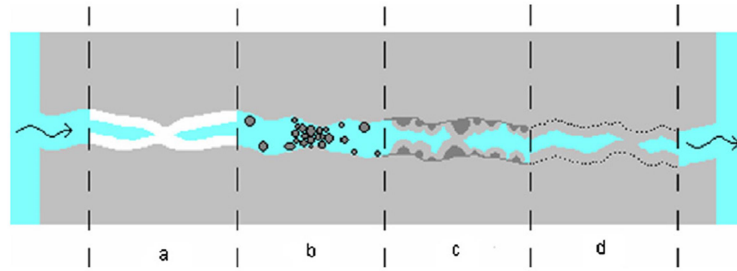


Figure 4 : Mécanismes impliqués dans l'autocicatrisation naturelle d'une fissure. (a) : formation de carbonate ou d'hydroxyde de calcium ; (b) : particules bloquées dans la fissure ; (c) : hydratation de grains de ciment anhydres ; (d) : expansion de la pâte de ciment [22].

Parmi ces mécanismes, l'hydratation du ciment anhydre et la carbonatation de la portlandite sont les phénomènes d'autocicatrisation naturelle les plus importants. Argouges (2010) [23] présente dans ses travaux une schématisation du processus d'autocicatrisation naturelle ne représentant que ces deux mécanismes principaux (Figure 5). Ce schéma montre la réduction de l'ouverture de la fissure par hydratation des grains de ciment anhydres et carbonatation de la portlandite présente dans la pâte. La composition de la pâte de ciment à proximité de la fissure est donc modifiée par les processus d'autocicatrisation, qui sont par la suite décrits plus en détail.

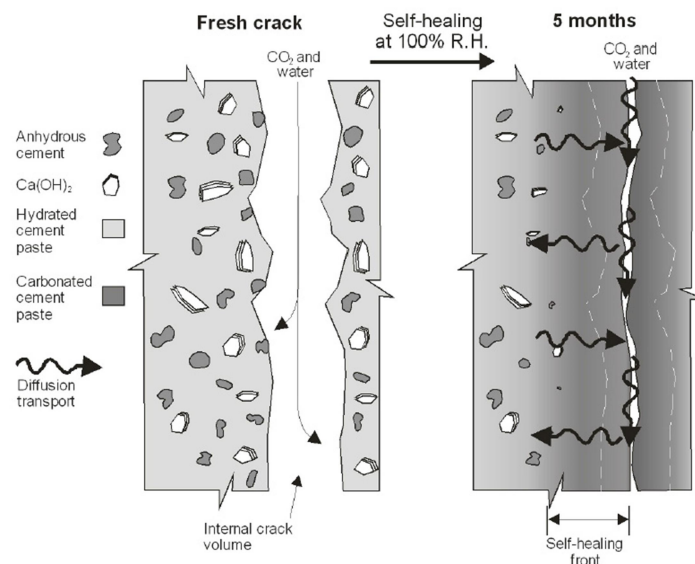


Figure 5 : Représentation schématique de l'autocicatrisation par hydratation secondaire du ciment et carbonatation [23].

1.1.2.1. Hydratation des grains de ciment anhydres

Lors de la construction de l'ouvrage, bien que l'apport d'eau dans les mélanges cimentaires soit théoriquement suffisant pour permettre l'hydratation de la totalité du ciment, une partie du ciment n'est pas hydratée avant une longue période : Breugel (2007) estime qu'en moyenne, pour un ratio eau/ciment (E/C) de 0,4, environ 30 % du ciment n'a pas réagi après 28 jours de cure humide, et que ce pourcentage est d'autant plus élevé que le ciment est grossier [9]. Cette estimation est corroborée par Huang *et al.* (2013) [24], qui mesurent un taux d'hydratation de 66,7 % de la pâte ciment après 28 jours, pour des mortiers préparés avec du ciment portland ordinaire, ayant un ratio E/C de 0,3. La fissuration rend ces grains accessibles à l'hydratation ; cette réaction d'hydratation du ciment s'accompagne alors de la formation de deux phases, une phase amorphe de gel de silicate de calcium hydraté (C-S-H) et une phase cristalline d'hydroxyde de calcium (Ca(OH)_2 , CH en notation cimentière), qui réduisent l'ouverture de la fissure. La nature de ces composés est confirmée par Ismail (2006) [25], qui les identifie au sein de la fissure et observe aussi la formation d'ettringite (Figure 6).

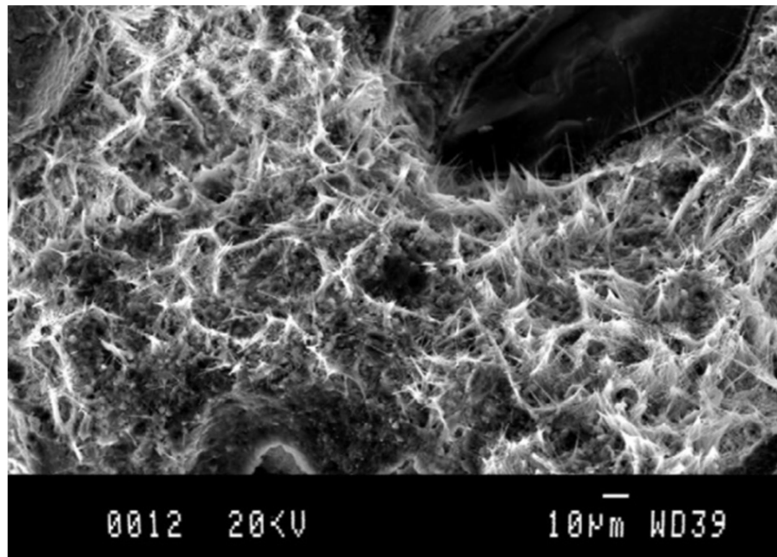


Figure 6 : Gel de CSH et ettringite formés au sein d'une fissure [25].

Huang *et al.* (2013) [24] réalisent des essais d'autocicatrisation sur des fissures de 10 μm réalisées sur des mortiers jeunes et isolées de l'atmosphère ambiante pour limiter la concentration en CO_2 et ainsi la carbonatation. Sur une période de 20 jours, l'immersion de la fissure conduit à une réduction d'ouverture de 50 % pour des mortiers curés pendant 28 jours avant fissuration, mais peut

atteindre 65 % pour les échantillons n'ayant été curés que durant 7 jours. L'autocicatrisation est principalement due à l'hydratation des grains de ciments anhydres, et conduit principalement à la formation de portlandite, qui représente environ 80 % de la réduction d'ouverture contre seulement 20 % pour le gel de C-S-H (Figure 7). Ces valeurs ne correspondent pas à la composition de la pâte de ciment hydratée, il y a donc formation d'hydroxyde de calcium supplémentaire dans les fissures par recristallisation d'une partie de l'hydroxyde de calcium initialement présent dans la matrice cimentaire.

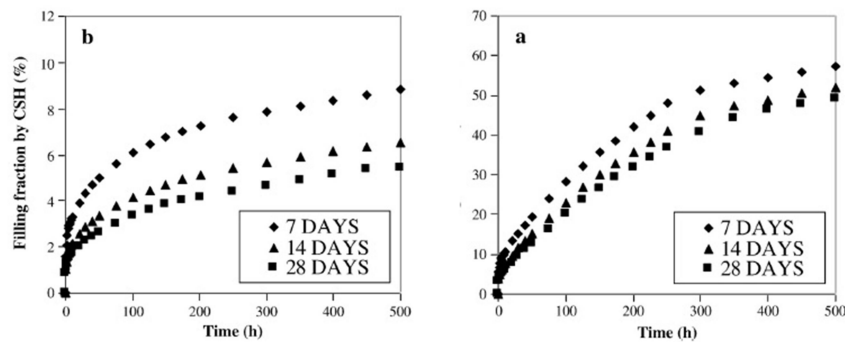


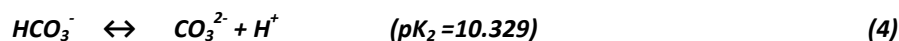
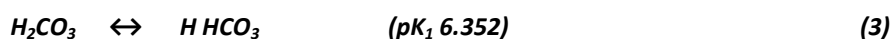
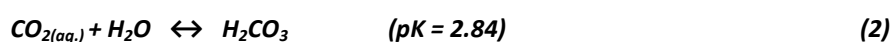
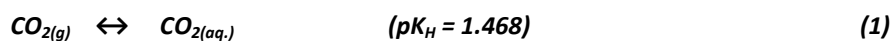
Fig. 18. Calculated filling fraction: (a) CH and (b) C-S-H.

Figure 7 : Produits d'autocicatrisation naturelle dus à l'hydratation du ciment [24].

Ce mécanisme d'autocicatrisation naturelle est rapide et se poursuit tant qu'il y a de l'eau jusqu'à ce que les grains de ciment exposés soient hydratés. Au bout d'un mois environ, l'essentiel des grains de ciment exposés a réagi et le processus d'autocicatrisation ralentit fortement [26]. Ce phénomène est d'autant plus important que le matériau est jeune ou riche en ciment, la quantité de grains non hydratés étant plus importante.

1.1.2.2. Carbonatation de la portlandite

Un autre phénomène important est le phénomène de carbonatation [14], issu de la combinaison de deux mécanismes : d'une part, la formation d'ions carbonate à partir du CO_2 dissous dans l'eau contenue dans la fissure, favorisée par l'alcalinisation de celle-ci par le béton.



D'autre part, la pâte cimentaire fournit des ions calcium, issus de la dissolution partielle de la portlandite ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) et dans une moindre mesure du gel de C-S-H. L'augmentation de la teneur en ions calcium combinée à une forte concentration en ions carbonate et un pH élevé provoquent la précipitation de CaCO_3 à l'intérieur de la fissure, le plus souvent sous forme de calcite (Figure 8), parfois d'aragonite, de vaterite ou d'ettringite, qui à plus long terme se dégradent pour former de la calcite.

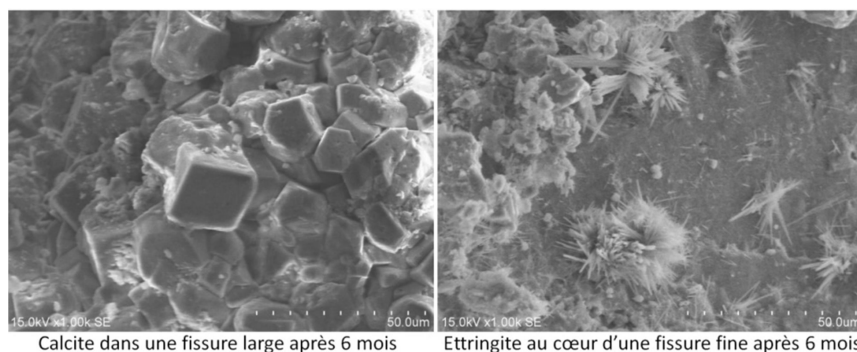


Figure 8 : Formation de calcite et d'ettringite au sein de fissures autocicatrisées par une cure humide (23°C, 100 % HR) [5].

Le début de ce processus est rapide mais vite limité par la vitesse de diffusion des ions calcium depuis la matrice vers la phase aqueuse, étant donné que le pool d'ions disponibles à proximité de la surface s'épuise et que celle-ci est progressivement recouverte par la couche de biocicatrisation.

1.1.3. Facteurs influençant l'autocicatrisation naturelle

1.1.3.1. Composition du matériau cimentaire

Les composés chimiques entrant dans la composition de certains matériaux cimentaires et leurs concentrations peuvent avoir un impact sur leur capacité d'autocicatrisation naturelle. Ainsi, des modifications de composition visant à modifier les performances mécaniques du béton, son ouvrabilité ou encore son impact environnemental peuvent avoir des conséquences inattendues sur sa durabilité. Ces impacts sur la capacité d'autocicatrisation du matériau peuvent être pris en compte dans la conception d'un ouvrage mais leur importance reste limitée.

Facteur E/C. Les bétons à haute performance (BHP) se caractérisent notamment par un faible rapport E/C et une grande quantité d'éléments fins, tels que la fumée de silice ou les cendres volantes. Cela se traduit par une importante proportion de grains de ciment anhydres dans le matériau fini, augmentant le potentiel d'autocicatrisation. En effet, le taux d'hydratation des grains de ciment dans ces matériaux avoisine 50 % après 28 jours de cure, tandis qu'il est de l'ordre de 65 % pour les bétons standard [27]–[29].

Fibres de renfort. Un autre facteur en jeu est la présence de fibres de renfort au sein du matériau. Ces fibres de polymère ou de métal réparties au sein de la matrice assurent une fonction de maintien améliorant la résistance en traction du matériau. Lors de la fissuration, les fibres perpendiculaires à l'axe de rupture jouent le rôle de ponts maintenant les faces de la fissure proches et réduisant la perte de résistance au point de fissuration (Figure 9). Les bétons fibrés ont donc tendance à avoir des fissures plus nombreuses et de plus petite taille : la présence de fibres limite l'ouverture des fissures à moins de 50 μm et les fissures créées sont suffisamment fines pour être totalement refermées par le processus d'autocicatrisation naturelle [27], [28], [30], [31].

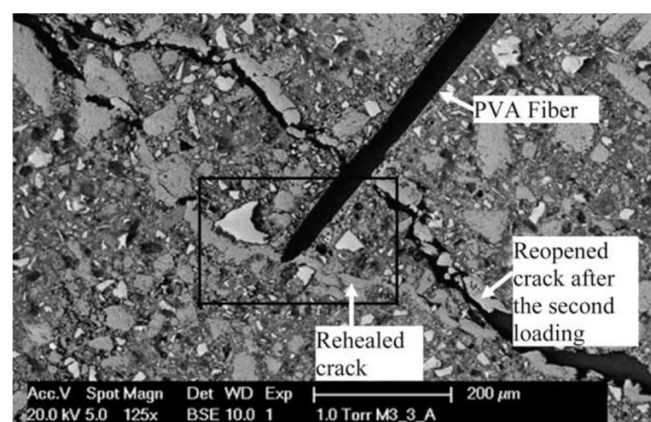


Figure 9 : Fibre de poly(alcool vinylique) (PVA) pontant une fissure de béton autocicatrisé, observée au MEB [31].

Fumées de silice. L'effet des fumées de silice sur l'autocicatrisation naturelle ne sont pas encore clairement définis. En effet, Jacobsen *et al.* (1995) [32] ont réalisé des essais de biocicatrisation en immergeant des mortiers fissurés durant deux mois dans de l'eau, en effectuant un comparatif entre mortiers contenant 5 % de fumée de silice et ceux n'en contenant pas. Si les premiers essais montrent que la fumée de silice a tendance à limiter la formation de produits d'hydratation des grains

de ciment anhydres dans la fissure et ainsi limiter l'autocicatrisation, cet effet n'a pas pu être confirmé ou infirmé lors d'essais supplémentaires [33]. Il s'agit cependant d'un composé provoquant des réactions pouzzolaniques pouvant contribuer à l'autocicatrisation du matériau, à l'instar des cendres volantes.

Cendres volantes. Les cendres volantes semblent contribuer à l'amélioration du potentiel d'autocicatrisation du matériau [34]–[36]. En effet, elles participent à des réactions pouzzolaniques lentes formant du gel de C-S-H, colmatant ainsi la fissure. De plus, les cendres volantes favorisent la formation d'un réseau dense de fissures fines plus favorables à l'autocicatrisation [37]. Ces réactions pouzzolaniques réduisent cependant la disponibilité de l'hydroxyde de calcium pour la formation de carbonate de calcium et peuvent limiter en ce sens le potentiel d'autocicatrisation.

Laitiers de haut-fourneau et poudres de calcaire. Les laitiers de haut-fourneau et les poudres de calcaire, sous-produits de l'industrie, sont ajoutés dans le mélange en remplacement du clinker pour réduire l'empreinte carbone du matériau. Ceci réduit sa capacité d'autocicatrisation car réduit la quantité finale de grains de ciment non hydratés et de cristaux de portlandite dans la matrice, mais il semblerait que cette diminution soit compensée par l'apport de sous-produits industriels [31].

1.1.3.2. Impact de l'environnement sur l'autocicatrisation naturelle

Le milieu extérieur peut jouer un rôle dans le processus d'autocicatrisation. D'une part, les intempéries auxquels sont soumis les ouvrages peuvent apporter des particules de petite taille et des solides dissous qui se déposent à faible profondeur dans la fissure et participent de manière marginale à son colmatage. D'autre part, les précipitations apportent l'eau et les composés nécessaires aux réactions citées ci-dessus et leur intermittence a un impact important sur l'efficacité de la biocicatrisation. En effet, Maes *et al.* (2016) [38] ont mesuré la vitesse de colmatage de fissures d'environ 100 μm pour des mortiers soumis à une immersion cyclique ou continue dans de l'eau. Ils ont constaté que le colmatage était deux fois plus rapide pour les échantillons soumis à des cycles d'immersion et de séchage que pour ceux continuellement immergés, permettant un colmatage total des fissures en 3 mois, contre 6 dans le cas d'une immersion continue (Figure 10). Les immersions cycliques assurent en effet le renouvellement du CO_2 à l'intérieur de la fissure et favorisent l'autocicatrisation par carbonatation de la portlandite, tout en déclenchant l'hydratation des grains de ciment anhydres à l'intérieur de la fissure.

En immersion continue, le renouvellement du CO_2 dans la fissure est moins important, ce qui réduit l'autocicatrisation par carbonatation. Ainsi, une fissure exposée à la pluie aurait une meilleure capacité d'autocicatrisation qu'une fissure continuellement immergée.

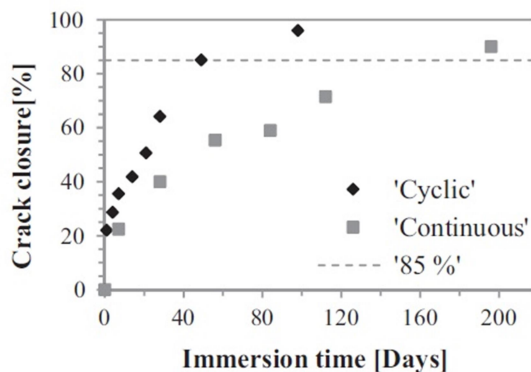


Figure 10 : Autocicatrisation naturelle de fissures en cycles d'immersion-séchage ou immergées en continu [38].

Certains composés présents dans l'environnement peuvent participer à l'autocicatrisation naturelle en réagissant avec la matrice cimentaire, formant des composés expansifs au sein de la fissure. Dans la même étude [38], les auteurs ont évalué l'effet de la présence d'ions chlorure et sulfate dans la solution d'immersion, simulant des environnements agressifs. Ils constatent que la présence d'ions chlorure (mélange de chlorures de sodium et de magnésium) engendre la formation de gypse et d'ettringite sur les surfaces de la fissure mais sans impact significatif sur l'ouverture de celle-ci. En revanche, la présence de sulfate de magnésium provoque la formation d'une couche superficielle de brucite au niveau des lèvres de la fissure, qui réduit légèrement l'ouverture. Le dépôt de brucite reste cependant superficiel, et sa durabilité peut donc être faible.

D'après Palin *et al.* (2015) [39], les ions calcium, carbonate et magnésium présents dans l'eau de mer peuvent avoir un impact important sur la biocicatrisation, favorisant la précipitation de minéraux tels que la brucite, la calcite ou l'aragonite. En effet, les échantillons testés montrent une réduction d'ouverture après 56 jours de traitement allant de 104 à 592 μm pour des ouvertures initiales de 600 à 1000 μm , en partie due à la présence d'une couche de brucite-aragonite présente uniquement sur les échantillons immergés dans de l'eau de mer. Bien que cette hypothèse ne soit pas abordée dans l'article cité, il est à noter que l'eau de mer est naturellement alcaline avec un pH compris entre 7,8 et 8,5 [40]. Cette alcalinité contribue à la précipitation de carbonate de calcium ou de magnésium au sein de la fissure et peut donc avoir un impact non négligeable sur le processus de

cicatrisation. L'importance du pH de l'eau d'immersion est confirmée par les travaux de Parks *et al.* (2010) [41], qui réalisent des essais par immersion dans des cuves contenant des eaux enrichies en sels minéraux divers et de pH égaux à 7, 8,5 ou 9,5. Les auteurs constatent que quelle que soit la composition du milieu, la présence de produits d'autocicatrisation n'est observable que pour les échantillons stockés à pH 8,5 ou 9,5.

Le colmatage total d'une fissure de près de 600 μm observé par Palin *et al.* (2015) [39] après 56 jours d'immersion dans l'eau de mer est attribué à la contribution d'ions présents dans l'eau, mais cette interprétation doit être considérée avec prudence. En effet, ce colmatage est considérablement supérieur à ceux obtenus au cours des autres travaux cités ultérieurement (de l'ordre de 100 μm) [38], [41], [42]. Cette différence peut être expliquée par la lixiviation d'ions depuis la matrice cimentaire : l'exposition de matériaux cimentaires à des environnements très humides peut engendrer la dissolution partielle de la portlandite de la matrice cimentaire, qui est transportée jusqu'à l'ouverture de la fissure où elle se carbonate en calcite au contact du CO_2 atmosphérique. Ce phénomène engendre la formation d'efflorescences de calcite à la surface du matériau pouvant être assez massives pour colmater des fissures larges. Il ne s'agit toutefois que d'un colmatage superficiel, et la lixiviation de la portlandite entraîne une baisse de la résistance du matériau ainsi qu'une augmentation de sa perméabilité. En outre, la formation anarchique d'efflorescences nuit fortement à l'esthétique de l'ouvrage (Figure 11). Dans le cas de l'étude de Palin *et al.* (2015) [39], la résistance en compression des échantillons est diminuée de 10 %, ce qui appuie l'hypothèse d'un rôle important de la lixiviation du calcium depuis la matrice cimentaire dans le colmatage des fissures.

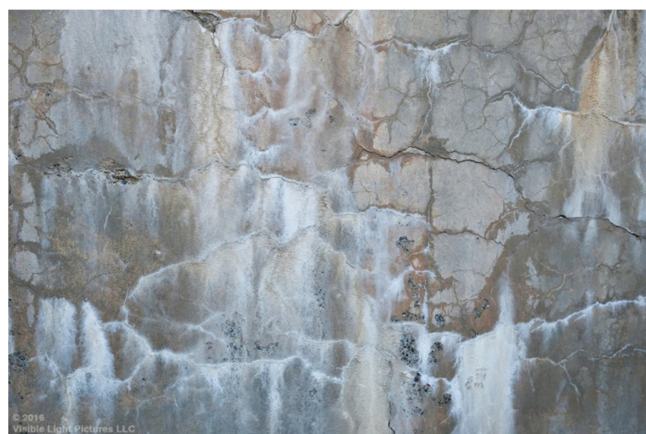


Figure 11 : Efflorescences de CaCO_3 sur un mur de béton fissuré (crédit : Visible Light Pictures 2016).

1.1.3.3. Efficacité de l'autocicatrisation naturelle

Les différentes études réalisées montrent que ce potentiel d'autocicatrisation naturelle est variable, même pour des matériaux cimentaires et des conditions de stockage proches. En effet, l'étude réalisée par Maes *et al.* (2016) [38] fait état d'un potentiel d'autocicatrisation naturelle inférieur à 100 μm , tandis que ce potentiel est supérieur à 150 μm pour les échantillons étudiés par Palin *et al.* (2015) [39]. Dans le cas de l'étude de Ducasse-Lapeyrosse *et al.* (2014) [43], ce potentiel est même de l'ordre de 50 μm après 6 mois de traitement (Figure 12). Pourtant, les essais réalisés au cours de ces études appliquent des conditions expérimentales proches : il s'agit d'échantillons de mortier ayant un ratio E/C compris entre 0,45 et 0,5, pour lesquels des fissures dont l'ouverture est comprise entre 100 et 150 μm sont créées après 28 jours de cure, et qui sont ensuite immergés dans de l'eau à 20°C.

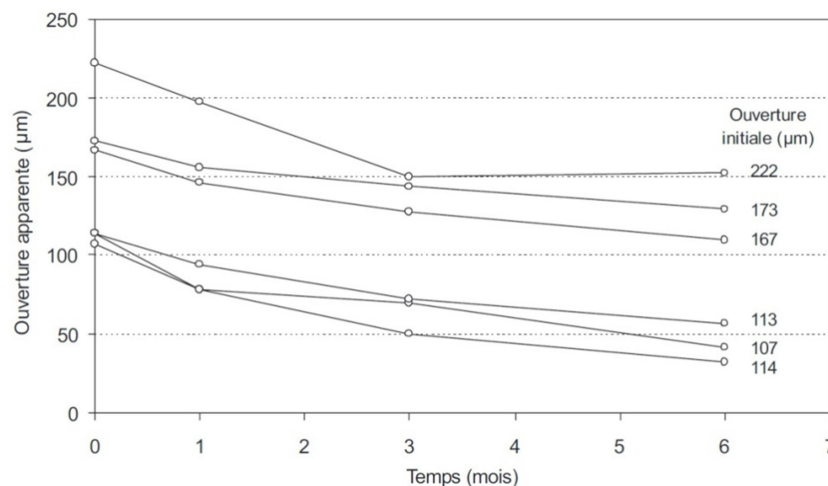


Figure 12 : Evolution de l'ouverture apparente de fissures de mortier soumis à une autocicatrisation naturelle [43].

La capacité d'autocicatrisation naturelle peut donc varier du simple au triple malgré des échantillons et des conditions de stockage similaires. De nombreux facteurs entrent en effet en jeu au cours de la vie du matériau et impactent sa capacité d'autocicatrisation naturelle à différents degrés, rendant difficile la prédiction du processus :

La composition du matériau, et en particulier sa teneur en ciment ;

- L'âge de la fissuration et la dimension des fissures. Le premier facteur détermine la composition du matériau lors de la fissuration, le second détermine les interactions entre la fissure et le milieu extérieur ;
- Les conditions environnant la fissure. L'humidité, le pH et les teneurs en ions au sein de la fissure ont un impact majeur sur l'autocicatrisation naturelle de celle-ci.

La capacité d'autocicatrisation naturelle des matériaux cimentaires en l'absence de facteurs externes contribuant à l'améliorer est donc à la fois variable et limitée. Les échantillons témoins réalisés au cours des études citées ci-après constituent une source de données importante pour estimer la capacité d'autocicatrisation naturelle des matériaux cimentaires et étayent cette conclusion : bien que la composition des matériaux et la méthode de cure (apport d'eau, durée, température) puissent varier, les échantillons non traités ont une capacité d'autocicatrisation inférieure à 200 μm . L'autocicatrisation naturelle est donc un mécanisme insuffisant pour empêcher la propagation de fissures dans les ouvrages. De fait, de nombreuses études ont visé à développer des moyens d'améliorer le potentiel d'autocicatrisation des matériaux cimentaires.

1.1.4. Techniques d'amélioration du potentiel d'autocicatrisation

Certains constituants des matériaux cimentaires ont pour effet secondaire de favoriser l'autocicatrisation naturelle du matériau, mais ce n'est généralement pas leur rôle principal. Toutefois, certains éléments peuvent être ajoutés au matériau uniquement dans ce but : il peut s'agir de favoriser les mécanismes d'autocicatrisation naturelle, ou bien de faire intervenir des composés différents venant colmater la fissure. Il est ainsi possible non seulement d'augmenter la durée de vie du matériau, mais aussi de réduire le coût de l'ouvrage à long terme [9]. De nombreuses études ont contribué à la mise au point de matériaux cimentaires ayant des propriétés auto-réparatrices, et les méthodes pour y parvenir sont variées :

- L'augmentation du phénomène d'autocicatrisation naturelle, par le biais de composés favorisant les réactions chimiques liées à ce phénomène (hydrogels, ou précurseurs de précipitation de carbonate de calcium tels que le lactate de calcium ou le gluconate de calcium) ;
- L'introduction de matériaux de réparation se délivrant de manière autonome ou partiellement autonome dans la fissure (capsules ou tubes contenant des polymères);

- L'introduction de bactéries pouvant provoquer la précipitation de carbonate de calcium, appelée autotolmaturation, que nous aborderons dans la section 1.3.3.

Hydrogels. L'hydratation des grains de ciment encore anhydres de la matrice est un processus nécessitant de l'eau, et l'humidité ambiante de l'air ne suffit pas à fournir cet apport en eau. De fait, les publications étudiant l'autotolmaturation par hydratation des grains de ciment anhydres montrent une faible autotolmaturation pour les échantillons n'ayant pas été curés en milieu humide après fissuration (voir section 1.1.2). Les hydrogels favorisent cet apport d'eau grâce à leur caractère hygroscopique. En effet, inclus à la matrice cimentaire, ils absorbent l'eau du milieu extérieur pour le restituer dans leur environnement proche, favorisant ainsi l'hydratation des grains de ciment anhydres en l'absence d'une cure en milieu humide [44].

Complémentation de précurseurs. Certains composés libèrent des ions calcium et/ou des ions carbonate dans les fissures, ce qui favorise la précipitation de carbonate de calcium et ainsi le colmatage des fissures. Pour cette raison, ces composés sont souvent appelés « précurseurs ». Kishi *et al.* (2007) [45] ont amélioré la capacité d'autotolmaturation en préparant des mortiers contenant 10% de différents carbonates (NaHCO_3 , Na_2CO_3 ou Li_2CO_3) ou de sulfoaluminate de calcium ($\text{C}_4\text{A}_3\bar{\text{S}}$) ; ceux-ci favorisent la précipitation de minéraux expansifs variés (AFt, sulfate et hydroxy AFm, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou hydrate de Gehlenite) issus de la recristallisation de la pâte cimentaire lixiviée dans les fissures. Ces minéraux sont qualifiés d'expansifs car ils sont de volume supérieur aux réactifs initiaux. Ainsi, leur formation a permis le colmatage de fissures ayant une ouverture égale à 220 μm après un mois de cure dans l'eau. Ducasse-Lapeyrousse *et al.* (2017) [5] ont étudié l'impact de l'ajout externe de précurseurs dans les fissures, en immergeant des échantillons de mortier fissurés dans des solutions de lactate de calcium ou de gluconate de calcium. Les auteurs ont montré que la présence de précurseurs permet de colmater presque totalement des fissures ayant une ouverture initiale égale à 150 μm , tandis qu'une immersion dans l'eau distillée ne permet qu'un colmatage partiel de fissures de cette taille, la couche de cicatrisation étant inférieure à 100 μm .

Polymères : L'introduction de polymères lors du mélange engendre la formation d'un réseau tridimensionnel dans la matrice qui enveloppe certains grains. Ceci permet d'augmenter la proportion de grains de ciment anhydres dans la matrice, et donc le potentiel d'autotolmaturation du matériau. Abd El Moaty *et al.* (2011) [46] ont observé que l'ajout de 10% de caoutchouc de styrène-butadiène ou de l'acrylique au mélange cimentaire a pour conséquence la réduction du taux d'hydratation du ciment de 71 à 66 % après 28 jours de cure, et améliore de 15 à 20 % le degré de réparation après 60

jours de cure humide pour un taux de dommages initial compris entre 25 et 70 % mesuré par ultrasons.

Capsules : Des microcapsules (de silicagel, verre ou polymère) renfermant des polymères à durcisseur sont ajoutées au mélange cimentaire. Lors de la fissuration, les capsules sont brisées, libérant le monomère et le catalyseur ; la fissure est alors refermée par le polymère produit [47]–[49]. Certaines études envisagent d'utiliser seulement des capsules d'eau destinée à accélérer le phénomène d'autocicatrisation naturelle [42], [50]. Ces systèmes sont toutefois coûteux, réduisent la résistance du matériau, et la fissuration ne brise pas toujours les capsules.

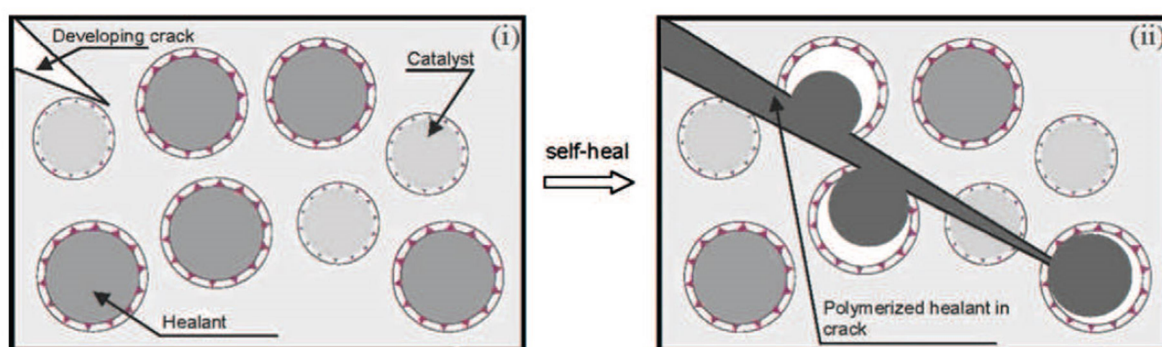


Figure 13 : Système d'autocicatrisation par capsules [47].

En introduisant des microcapsules de mélange gomme-gélatine contenant du silicate de sodium dans le mélange cimentaire, Kanellopoulos *et al.* (2016) [51] ont pu améliorer le potentiel d'autocicatrisation des échantillons fissurés, jusqu'à 50 % après 28 jours de cure. Les capsules provoquent la formation dans les fissures de produits d'hydratation secondaires, tels que l'ettringite et le gel de C-S-H. L'amélioration de l'autocicatrisation n'est cependant significative que pour les mélanges contenant plus de 8 % de microcapsules, pour lesquels une perte de résistance en compression allant jusqu'à 15 % ainsi qu'une augmentation de la viscosité du mélange cimentaire sont observées (Figure 14). Malgré cet inconvénient, ces capsules peuvent avoir un impact positif non mentionné par l'auteur : le silicate de calcium étant un composé très alcalin, ces capsules peuvent ralentir la carbonatation du béton et protéger les barres d'armature en acier contre le phénomène de dépasse.

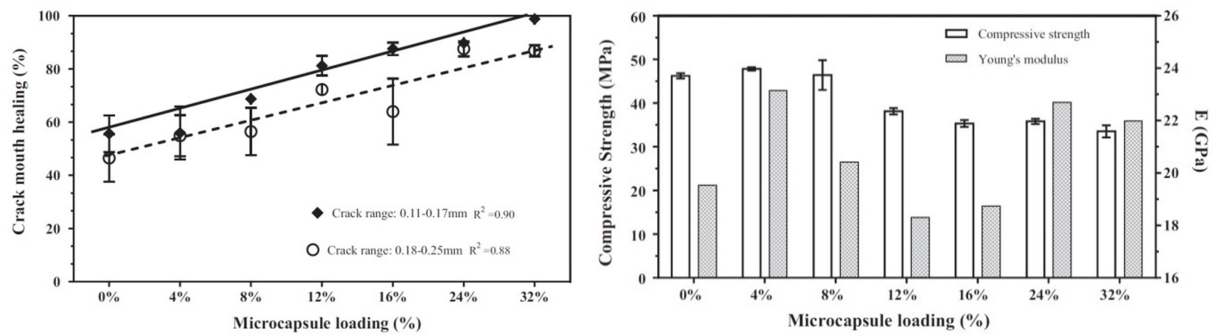


Figure 14 : Impact de l'introduction de microcapsules de silicate de sodium sur l'autocicatrisation et les propriétés mécaniques de bétons [51].

Systèmes vasculaires : L'efficacité des capsules est limitée par le risque qu'elles ne se brisent pas lors de la fissuration. En réponse à cet obstacle, il a été envisagé d'utiliser des tubes de verre plutôt que des capsules pour libérer l'agent de réparation, de la mousse de polyuréthane dans les cas cités ci-après. Tittelboom *et al.* (2011) [52] ont réalisé des mortiers contenant des tubes de verre ou de céramique (Figure 15), libérant lors de la fissuration les précurseurs de polymérisation de la mousse de polyuréthane. L'ajout de tubes de céramique ou de verre n'a pas altéré la résistance du matériau, et la libération de l'agent de réparation a permis un regain de 50 à 60 % de la résistance initiale. Un système similaire est utilisé par Feiteira *et al.* (2016) [53], qui introduit des tubes contenant un précurseur de polyuréthane s'activant par contact avec l'eau et présentant une forte élasticité, de pouvoir moussant variable. Ces résines peuvent absorber 100 % d'élongation sans se briser grâce à leur souplesse, ce qui assure le maintien de l'efficacité de la réparation dans des fissures dont l'ouverture évolue au cours du temps. Ce système est toutefois encore plus onéreux et complexe à mettre en œuvre que des capsules sphériques. L'auteur souligne en outre que les tubes de verre utilisés sont trop fragiles pour être compatibles avec les méthodes actuelles de construction des ouvrages.

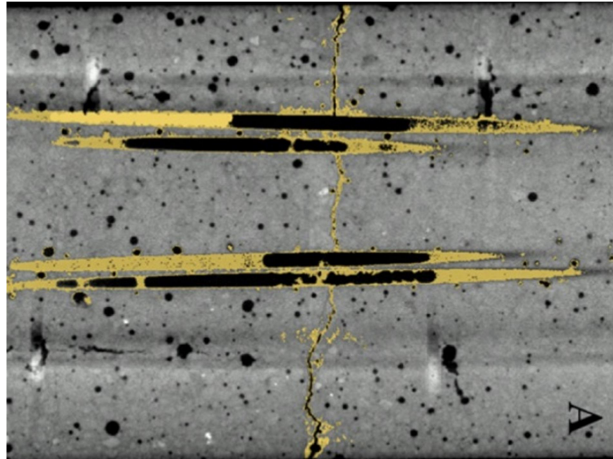


Figure 15 : Vue en coupe d'un béton fissuré contenant des tubes de 2 mm de section contenant de la mousse de polyuréthane [52].

Qureshi *et al.* (2016) [54] ont employé des tubes concentriques contenant séparément de l'eau et des minéraux produisant des composés expansifs lors de leur hydratation (MgO, bentonite et chaux vive). Ces tubes occupent 4,1 % de la section des éprouvettes de mortier, et permettent de réduire de 90 % la surface ouverte de fissures d'ouverture comprise entre 360 et 380 μm après 56 jours de cure en immersion, contre 70 % environ pour le témoin. Ce colmatage permet une récupération de la résistance au chargement allant jusqu'à 30 %, l'impact de l'inclusion des tubes dans les éprouvettes de mortier sur leurs performances mécaniques n'est toutefois pas indiqué.

Système poreux : Sangadji *et al.* (2013) [55] ont imaginé un système inspiré de la structure des os : l'essentiel de l'ouvrage est constitué de béton imperméable, mais possède un cœur poreux, servant de conduite d'injection pour introduire un agent de réparation après fissuration de l'ouvrage. C'est un système ingénieux, mais les impacts sur la résistance du béton, les coûts de réalisation ainsi que la possibilité de réaliser plusieurs réparations restent à définir.

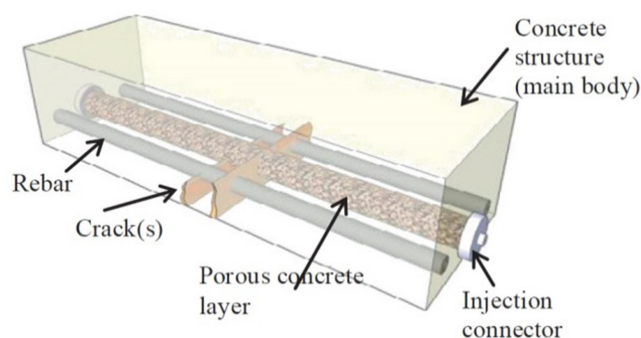


Figure 16 : Système de béton à cœur poreux [55].

Fibres rétractiles : Jefferson *et al.* (2010) [56] utilisent la propriété qu'ont certains polymères de se rétracter sous l'effet de la chaleur pour refermer les fissures : après la fissuration, la fissure est chauffée à 90°C, ce qui provoque la contraction des fibres, refermant complètement une fissure de 300 µm d'ouverture (Figure 17). Cette technique implique toutefois une intervention directe au point de fissuration, là où d'autres méthodes permettent un processus de réparation totalement autonome.

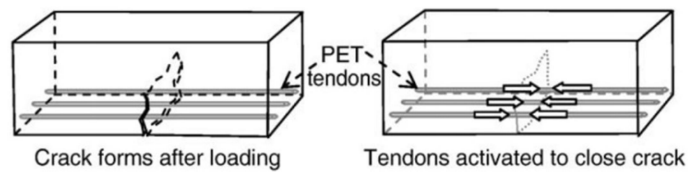


Figure 17 : Fermeture d'une fissure par activation de fibres rétractiles [56].

Ces systèmes présentent un certain potentiel pour la réparation de fissures dans les matériaux cimentaires, mais la plupart font encore grandement recours aux résines synthétiques utilisées pour la réparation conventionnelle, composés polluants dont la durée de vie est limitée (voir section 1.1.1). Le carbonate de calcium étant le matériau de réparation idéal, les méthodes de reposant sur la formation de carbonate de calcium par voie microbienne sont en plein développement.

1.2. La biominéralisation

La biocicatrisation des matériaux cimentaires repose sur le phénomène de biominéralisation. La biominéralisation est la précipitation de certains ions en composés minéraux solides par le biais d'une activité biologique, phénomène pouvant résulter de nombreux mécanismes. Nous nous intéresserons ici à la biominéralisation bactérienne induite : les minéraux sont formés indirectement par l'activité cellulaire, dans son environnement proche [57].

Au cours de ce processus, l'activité bactérienne modifie les propriétés du milieu environnant provoquant la précipitation de minéraux, notamment de carbonate de calcium. La précipitation microbienne de carbonate de calcium (MCP, *Microbial Carbonate Precipitation*), à l'origine d'une partie des concrétions calcaires naturelles [58], suscite aujourd'hui un intérêt croissant dans l'industrie. Elle permet de produire des minéraux variés en conditions douces, mais aussi de

séquestrer des micropolluants organiques ou métalliques dans le cadre de la dépollution des eaux et des sols [59].

Le cas particulier de la biodéposition de carbonate de calcium commence à être utilisé pour des applications variées :

- Biomédical, par exemple avec la régénération osseuse [60] ;
- Consolidation des sols pour limiter l'érosion ou l'affaissement [61] ;
- Protection de surface des bâtiments (voir section 1.3.2).

Malgré une grande variété d'environnements naturels (sources thermales, lacs salés, milieux hypersalins...) et de mécanismes entrant en jeu (voir section 1.2.1), la MCP se traduit par la formation d'un « *Microbial Mat* » (lit bactérien) [57], matrice mêlant un biofilm bactérien aux minéraux précipités, résultat de deux processus :

- L'activité bactérienne peut selon les cas générer du carbone inorganique dissous, des ions calcium libre, et/ou une alcalinisation locale du milieu. Chacun de ces facteurs contribue à la précipitation de carbonate de calcium ;
- La production d'un biofilm bactérien, matrice protectrice essentiellement composée de substances polymériques extracellulaires excrétées par les bactéries (Extracellular Polymeric Substances, EPS).

1.2.1. Mécanisme de biominéralisation

La biominéralisation est essentiellement due à l'activité bactérienne, par la modification des propriétés du milieu conduisant à la précipitation de carbonate de calcium. En effet, la précipitation de carbonate de calcium dépend de quatre facteurs : la quantité de carbone inorganique dissous (DIC), la quantité d'ions calcium en solution, le pH, et l'existence de sites de nucléation [62].

Pour un pH donné, ces facteurs définissent l'indice de saturation IS :

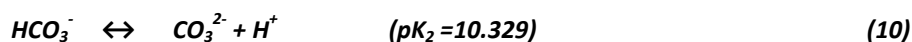
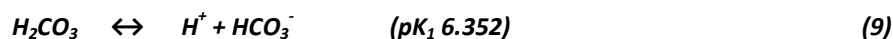
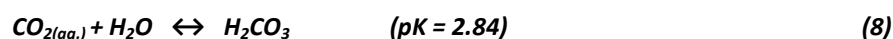
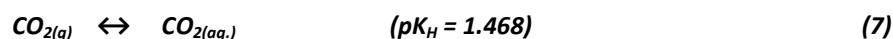
$$IS = \log(PAI/K_{sp}) \quad (5)$$

Où PAI est le produit d'activité ionique ($[CO_3^{2-}] * [Ca^{++}]$), et K_{sp} le coefficient de solubilité du minéral (pour le $CaCO_3$, à 25°C, $K_{sp}=4,8.10^{-9}$) [63]. Quand $IS > 0,8$ (1 en l'absence de site de

nucléation), les concentrations en ions calcium et en ions carbonate sont suffisantes pour que la réaction de précipitation ait lieu :



La teneur en ions Ca^{++} est donnée par la quantité d'ions apportés au milieu, mais la teneur en ions CO_3^{2-} est principalement déterminée par le pH à travers l'équilibre des ions bicarbonate [64]. En effet, l'ion bicarbonate (HCO_3^-) est formé par dissolution du CO_2 atmosphérique dans l'eau, qui selon le pH donne lieu à la formation d'acide carbonique (H_2CO_3) (en milieu acide) ou de l'ion carbonate (CO_3^{2-}) (en milieu basique). L'eau douce et l'eau de mer étant alcalines, l'équilibre de ces réactions tendra vers la formation d'ions carbonate plutôt que d'acide carbonique, favorisant ainsi la précipitation de carbonate de calcium.



Les bactéries peuvent déplacer ces équilibres par leur activité métabolique : celles-ci augmentant la concentration en ions CO_3^{2-} dans leur environnement en augmentant le pH de leur milieu, ce qui provoque alors la précipitation de carbonate de calcium.

Dans un milieu alcalin riche en ions calcium, les bactéries sont exposées à un milieu hostile : à l'inverse de leur milieu intracellulaire, le milieu extérieur est pauvre en protons (H^+) du fait du pH élevé, et riche en ions calcium. Cette différence de concentrations se traduit par deux flux passifs : l'entrée d'ions calcium dans la cellule, et la sortie de protons. Afin de maintenir des conditions permettant la survie de la cellule, ces flux passifs doivent être compensés par un flux actif inverse : l'expulsion d'ions calcium vers l'extérieur de la cellule et le pompage de protons à l'intérieur de la cellule.

Il résulte de ces deux transferts deux microenvironnements de part et d'autre de la cellule :

- Où les transferts passifs ont lieu, il y a acidification locale du milieu et diminution de la concentration en calcium libre ;

- Où les transferts actifs se produisent, il y a au contraire une alcalinisation locale et une augmentation de la concentration en ions calcium.

Ces deux facteurs favorisent la précipitation de carbonate de calcium par la sursaturation locale en ions Ca^{++} et la formation d'ions HCO_3^- issus du CO_2 produit par la respiration cellulaire (Figure 18).

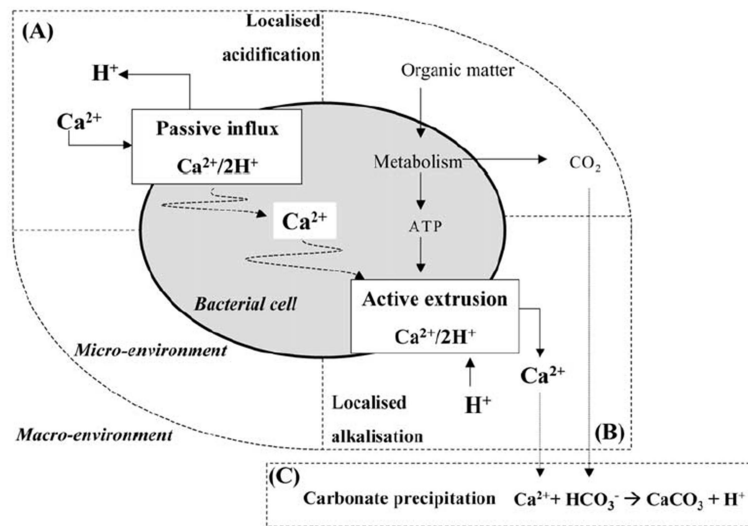


Figure 18 : Mécanisme de formation de CaCO_3 par biominéralisation induite [62].

La production de carbonate de calcium peut être amplifiée en utilisant une source de carbone comprenant du calcium, par exemple le lactate de calcium ou le gluconate de calcium. En effet, la consommation de ces composés par la cellule contribue non seulement à la production de carbonate suivant le processus décrit plus haut, mais libère aussi des ions calcium dans le milieu, ce qui favorise la précipitation de carbonate de calcium [65]. Pour certaines souches bactériennes, leur charge négative en surface, appelée ζ -potentiel, peut contribuer à la biominéralisation en attirant les ions calcium de charge opposée à proximité de la bactérie. La sursaturation locale en ions calcium provoque la précipitation de CaCO_3 , formant une gangue autour de celle-ci [66]. Cette gangue coupe la cellule du milieu extérieur, ce qui finit par lui être fatal (Figure 19). Toutefois, ce phénomène peut être évité par la formation d'un biofilm : celui-ci fournit des sites de nucléation pour la formation de CaCO_3 , réduisant ainsi la quantité formée à la surface de la cellule et retardant sa mort [67].

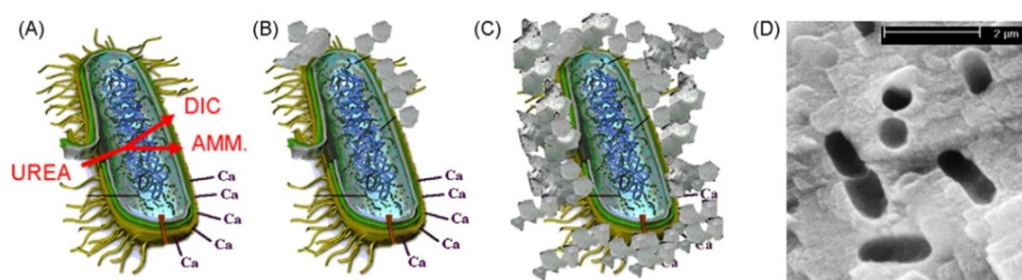


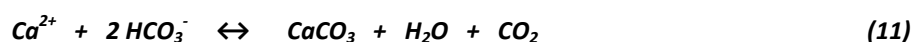
Figure 19 : Formation (A) et accumulation (B et C) de CaCO_3 autour de la cellule suite à la consommation d'urée, et « empreintes » des bactéries dans la couche de biocalcite (D) [4].

1.2.2. Principales voies de biominéralisation microbienne

Différents microorganismes utilisent différents substrats pour leur survie. Dans certains cas, les métabolismes impliqués peuvent eux-mêmes être à l'origine de la précipitation de carbonate de calcium. Les principales voies métaboliques impliquées sont :

- CO_2 atmosphérique, par voie photosynthétique ou non ;
- Ions sulfate ;
- Composés azotés (urée, acides aminés, nitrates) ;
- Acides organiques.

Autotrophie. Les organismes autotrophes sont capables d'utiliser le CO_2 atmosphérique comme source de carbone pour produire de la matière organique. Dans un milieu riche en ions calcium, la consommation du CO_2 et la production d'ions HCO_3^- par la cellule favorise la précipitation de CaCO_3 à travers la réaction suivante :



La plus importante source biologique de carbonate de calcium provient des microorganismes photosynthétiques, bien qu'une grande variété de bactéries soit capable de capter le CO_2 atmosphérique. Représentant le phytoplancton, cyanobactéries et algues sont responsables d'environ la moitié de la photosynthèse mondiale, et ont joué un rôle majeur dans la formation de certaines formations géologiques [68]. La consommation du CO_2 atmosphérique par le biais de la photosynthèse

déplace l'équilibre des ions bicarbonate vers la formation de carbonate de calcium, favorisant ainsi leur précipitation.

Bien que le processus métabolique exact ne soit pas encore entièrement élucidé et qu'il existe des différences entre les différents microorganismes, le fonctionnement général du processus de biominéralisation par les microorganismes photosynthétiques suit un schéma commun (Figure 20) : le CO_2 utilisé par la cellule pour réaliser la photosynthèse est concentré dans et autour de la cellule, et donne lieu à la formation de matière organique mais aussi d'ions HCO_3^- . Le processus de photosynthèse libère des ions HO^- hors de la cellule, ce qui se traduit par une alcalinisation des substances polymériques extracellulaires (EPS) entourant la cellule et la transformation des ions HCO_3^- en ions CO_3^{2-} . Ces ions réagissent enfin avec les ions calcium libres pour former un précipité de CaCO_3 autour de la cellule.

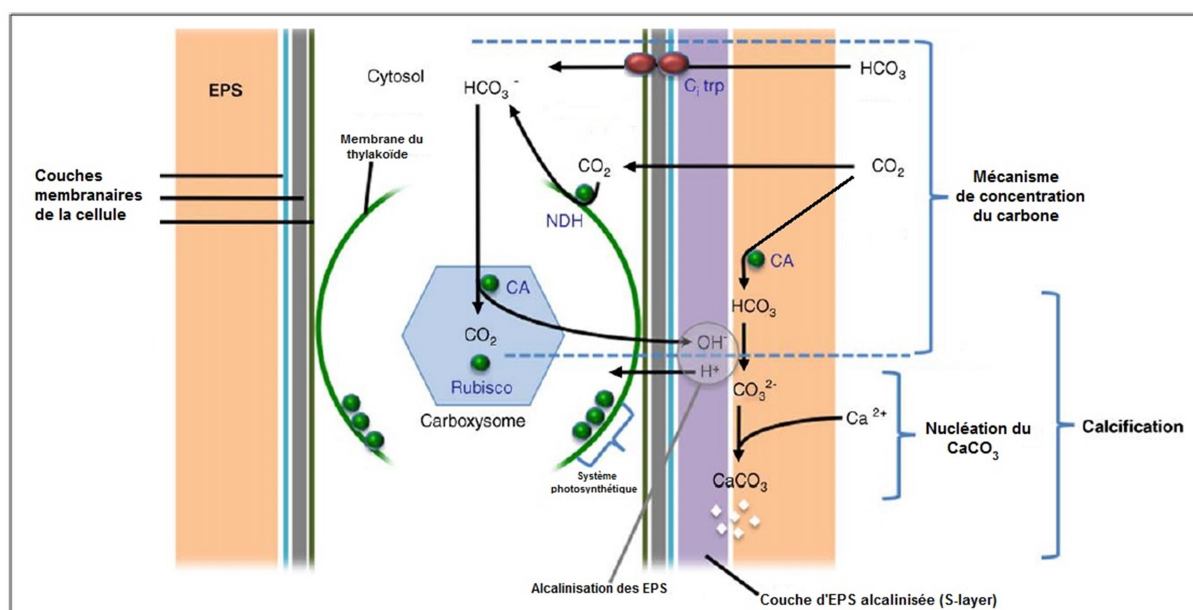


Figure 20 : Processus de biominéralisation de CaCO_3 par les cyanobactéries [68].

Les composés azotés peuvent aussi être impliqués dans des processus de biominéralisation. Il existe plusieurs réactions de dégradation des composés azotés par les bactéries, dépendant de la nature du substrat, pouvant être regroupées en trois types : l'ammonification des acides aminés,

l'hydrolyse de l'urée et la réduction des ions nitrate. Ces mécanismes sont souvent rencontrés chez les bactéries du sol du fait de leur importance dans le cycle de l'azote.

Ammonification d'acides aminés. Cette réaction observée par exemple chez *Bacillus cereus* a pour base la dégradation enzymatique d'acides aminés. Il en résulte la formation d'acides cétoniques et d'ammoniac, ce qui augmente le pH du milieu et favorise ainsi la précipitation de carbonate de calcium (CaCO₃) [43].

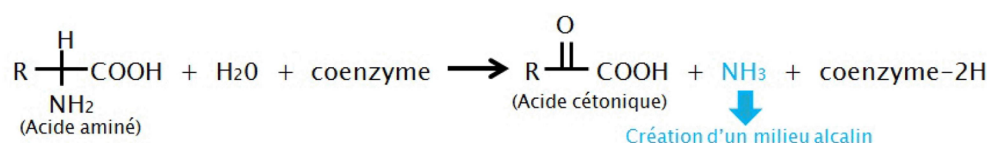
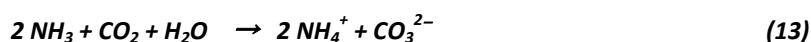
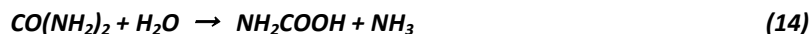


Figure 21 : Désamination bactérienne des acides aminés [43].

Dégradation de l'urée. La production de carbonate de calcium par le biais de la dégradation de l'urée est parmi les mécanismes les plus employés pour l'étude de la biominéralisation ainsi que pour ses applications en biocicatrisation [69]. Les bactéries uréolytiques employées sont des bactéries aérobies, qui peuvent également être remplacées par des enzymes de type uréase préalablement extraites [70]. Lors de la dégradation de l'urée, il y a production d'ammoniac et de CO₂, qui en présence d'eau vont réagir pour former des ions ammonium et carbonate [62]. La précipitation de carbonate de calcium est donc favorisée par deux facteurs : l'alcalinisation du milieu par les ions ammonium et la réaction entre les ions carbonate et les ions calcium.



Dhami *et al.* (2013) [71] propose un mécanisme réactionnel légèrement différent, pour lequel l'intermédiaire réactionnel n'est pas de l'ammoniac mais de l'acide carbamique (NH₂COOH), mais dont les produits finaux sont identiques. L'acide carbamique se dégrade en effet en présence d'eau en ammoniac et en acide carbonique. L'ammoniac réagit avec l'eau pour former des ions ammonium et des ions hydroxyde, tandis que l'acide carbonique perd ses deux protons pour former un ion carbonate.



La réaction de dégradation microbienne de l'urée implique une molécule d'eau supplémentaire, conduisant à la formation d'un deuxième ion ammonium et d'un ion hydroxyde :



La dégradation de l'urée peut se dérouler différemment en présence d'une source d'ions calcium. Par exemple, le nitrate de calcium est souvent additionné au milieu de culture, afin de fournir une ressource en calcium importante pour la précipitation de carbonate de calcium [72]. En présence de nitrate de calcium, la dégradation de l'urée en milieu aqueux engendre directement la formation de carbonate de calcium, et libère en outre des ions nitrate et ammonium. Il y a donc un cumul des effets entre la production directe de $CaCO_3$ et l'alcalinisation du milieu par production de NH_4^+ .



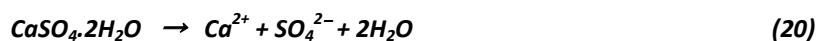
Réduction des ions nitrate. La réduction des ions nitrate (NO_3^-) est une chaîne de réactions se déroulant en atmosphère pauvre en dioxygène. La réduction des ions nitrate en présence de formate de calcium provoque l'alcalinisation du milieu en plus de la production directe de carbonate de calcium [72].



En milieu alcalin, si la réduction des ions nitrate se produit en absence d'ions calcium, elle engendre la production d'ions nitrite (NO_2^-) qui sont des inhibiteurs de corrosion. Maintenir une forte teneur en ions nitrite n'est toutefois possible que dans les conditions empêchant la dénitrification de se réaliser complètement. En effet, s'il y a un excès d'ions formate et de protons dans le milieu, les ions NO_2^- réagissent pour être dégradés en NO, puis en N_2O et enfin en N_2 , toutes ces réactions libérant du CO_2 et de l'eau [73].



Le métabolisme des composés soufrés peut aussi être un facteur de biominéralisation. La précipitation de carbonate de calcium par les bactéries sulforéductrices (SRB) en conditions anaérobies résulte de la présence de gypse dissous dans le milieu, sa consommation par les bactéries produisant du H₂S et des ions carbonate [62].



Pour obtenir l'alcalinisation du milieu nécessaire à la précipitation de carbonate de calcium et/ou de carbonate de magnésium, le H₂S doit être consommé, ce qui peut arriver dans la nature par réaction avec le fer (formation de pyrite) ou consommation par des bactéries (formation de soufre élémentaire). La précipitation de carbonate de calcium par le métabolisme du soufre donne en général des minéraux, tels que la dolomite (en présence de magnésium) ou l'aragonite.

1.2.3. Impact du biofilm sur la biominéralisation

Afin de survivre à des milieux parfois difficiles, une grande variété de microorganismes (bactéries, algues, champignons) peuvent produire une matrice complexe constituée de substances polymériques extracellulaires (*Extracellular Polymeric Substances, EPS*), qui enveloppe les microorganismes pour former un biofilm : une communauté de microorganismes dotée d'une structure spatiale capable de se maintenir sur un support. A l'échelle microscopique, un biofilm est un ensemble maintenant les microorganismes vivants et morts au sein d'une matrice essentiellement composée de polysaccharides et de molécules protéiques. A l'échelle macroscopique, les biofilms forment des pellicules pouvant faire plusieurs millimètres d'épaisseur, que l'on retrouve généralement fixées à des surfaces solides en milieu humide, mais qui peuvent coloniser une grande variété de milieux. La colonisation de surfaces par les biofilms est un phénomène nommé en anglais « fouling » conduisant en général à une nuisance pour l'utilisation de l'objet colonisé, comme par exemple la perte de performance pour la coque d'un bateau, l'émission d'odeurs désagréables dans la plomberie domestique ou encore la dégradation du matériau colonisé (bâtiments). Ceux-ci peuvent aussi avoir un rôle dans l'apparition et le développement de maladies s'ils sont formés d'organismes pathogènes.

On cherche donc en général à lutter contre la formation des biofilms, en empêchant leur adhésion ou la croissance des microorganismes. Cependant, leur productivité et leur résistance aux agressions extérieures sont des propriétés recherchées dans le domaine des biotechnologies et ces structures connaissent un regain d'intérêt, pouvant être exploitées notamment pour le traitement des eaux usées [74].

La vie d'une communauté de microorganismes au sein d'un biofilm suit un cycle bien particulier (Figure 22). Dans un premier temps, les bactéries libres (1) entrent en contact avec le support, et y adhèrent de manière réversible. Cette adhésion se réalise principalement *via* des interactions chimiques faibles, telles que les forces de Van der Waals, électrostatiques ou acide-base de Lewis entre les protéines membranaires du microorganisme et la surface du matériau (2). Cette adhésion est facilitée par le vieillissement du matériau dans son environnement, vieillissement qui se traduit par l'adsorption de nutriments à sa surface, l'augmentation de sa rugosité, la diminution de son pH et le lessivage de composés hostiles au développement microbien, un ensemble de modifications rendant la surface du matériau plus propice à l'adhésion, à la survie et au développement de microorganismes. L'excrétion d'une colle protéique par les microorganismes, ainsi que leur fixation physique par des pilis, rend définitive cette adhésion (3). La multiplication exponentielle des bactéries conduit à la formation d'un biofilm bidimensionnel ou micro-colonie (4) au sein de laquelle la production d'EPS est initiée. Le biofilm se développe ensuite dans l'espace grâce à l'excrétion continue d'EPS, qui permet son agrandissement dans les trois dimensions et contribue à son maintien sur le support (5). Le biofilm mature est un ensemble complexe composé à plus de 75 % d'EPS, abritant un consortium de microorganismes dont les métabolismes sont mutuellement profitables. Le détachement occasionnel de morceaux de biofilm, ou planctonisation, permet la dissémination des bactéries, qui pourront perpétuer ce cycle sur d'autres surfaces (6) [75], [76].

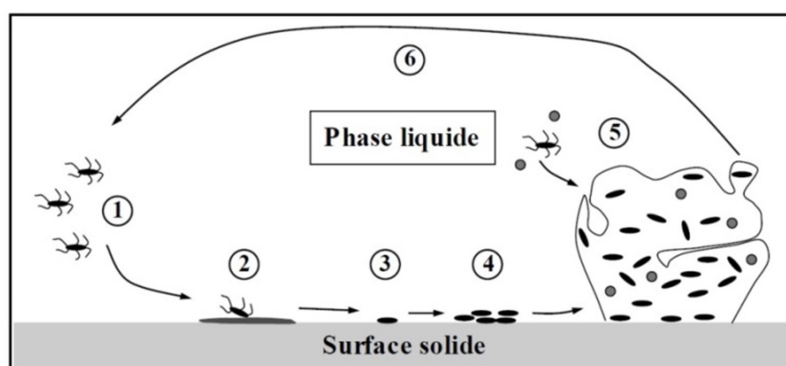


Figure 22 : Cycle de vie d'un biofilm sur une interface liquide/solide [75].

La composition du réseau d'EPS peut varier de manière très importante selon les microorganismes étudiés et les conditions de culture, mais est principalement constitué de protéines, de polysaccharides et de substances humiques, ainsi que d'ADN extracellulaire et de lipides en moindres quantités (Tableau 1). A ces EPS s'ajoutent une variété d'éléments apportés par le milieu environnant ou excrétés par les microorganismes ; le biofilm est donc un réseau complexe mêlant EPS, cellules vivantes et mortes, déchets métaboliques et composés emprisonnés [59], [77].

Tableau 1 : Composition et propriétés majeures des EPS [59].

Components of the EPS	Typical content in the EPS matrix	Important properties of different components	Remarks	References
Polysaccharides	40–95%	Adhesion, aggregation of bacterial cells, retention of water, adsorption of organic and inorganic compounds, binding of enzymes, nutrient source, and protective barrier to cells.	Play main role in flocculation and biosorption. The concentration and characteristics of the polysaccharides decide the fate of surface properties as well as biodegradability of the EPS.	(Flemming and Wingender, 2010; Tian, 2008; Wingender et al, 1999)
Proteins	1–60%	Adhesion, aggregation of bacterial cells, retention of water, sorption of organic and inorganic compounds, binding of enzymes, electron donor or acceptor, and protective barrier to cells.	Play main role in flocculation and biosorption. The concentration and characteristics of the protein decide the fate of surface properties as well as biodegradability of the EPS.	(Flemming and Wingender, 2010; Tian, 2008; Wingender et al, 1999)
Nucleic acids	1–10%	Adhesion, aggregation of bacterial cells, nutrient source, exchange of genetic information, export of cell components, and exchange of genetic information.	Nucleic acids have an important role in flocculation and biosorption depending upon the quantity and available components.	(Flemming and Wingender, 2010; Tian, 2008; Wingender et al, 1999)
Lipids	1–10%	Export of cell components	Major to minor role in flocculation and biosorption.	(Flemming and Wingender, 2010; Tian, 2008; Wingender et al, 1999)
Humic substances	—	Adhesion, Electron donor or acceptor	Minor role in the flocculation and biosorption. The impact of humic substances mainly depends upon its concentration as well as the nature of humic substances.	(Flemming and Wingender, 2010; Tian, 2008; Wingender et al, 1999)

Le biofilm remplit plusieurs rôles vitaux pour les microorganismes qu'il héberge, et leur confère en général une plus grande résistance [57] :

- En créant un microenvironnement, il contribue principalement à la résistance à la déshydratation et crée une barrière face aux agressions physiques et chimiques extérieures (biocides, déséquilibres osmotiques ou rayons UV) ;
- Les EPS, en particulier les polysaccharides, peuvent aussi constituer une réserve de nutriments pour les bactéries, assurant sa survie en cas de pénurie ;
- Par ses propriétés d'adhésion, le biofilm permet le maintien des cellules bactériennes sur un support, malgré les contraintes mécaniques pouvant lui être appliquées (courant, frottements...) ;
- Il favorise la dissémination des microorganismes en permettant la survie des cellules dans les portions de biofilms arrachées du support, ainsi que leur adhésion sur de nouveaux supports ;

- Il permet la communication chimique entre les cellules (*quorum sensing*), permettant par exemple une réponse de l'ensemble de la communauté bactérienne face à un environnement agressif.

Dans le processus de biominéralisation, le biofilm peut avoir un rôle positif comme négatif sur la précipitation de carbonate de calcium, en fonction de sa nature et de son stade de développement. Les interactions entre les EPS composant le biofilm et les ions calcium sont en effet complexes, les EPS étant dotés de nombreux groupements fonctionnels (fonctions sulfate, carboxylate, phosphate, amine) pouvant se lier aux ions métalliques présents en solution (Figure 23). La biomasse même du biofilm peut représenter un facteur de colmatage des fissures, mais celui-ci est peu durable du fait de sa biodégradabilité. Il présente donc moins d'intérêt pour la biocicatrisation des matériaux cimentaires fissurés.

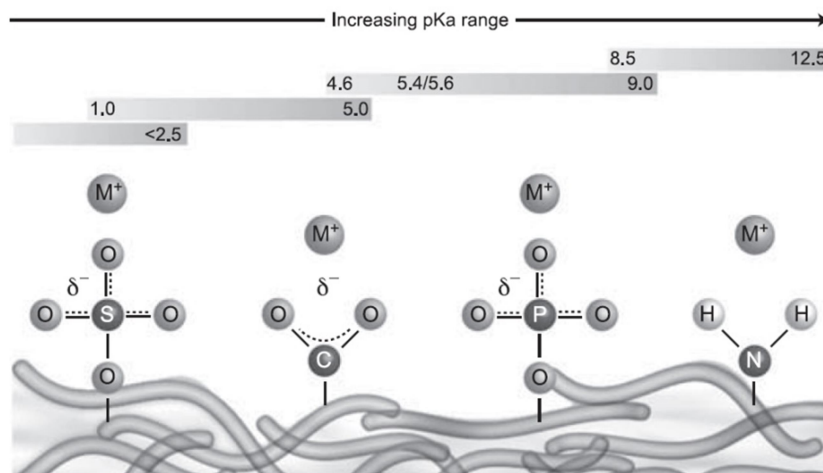


Figure 23 : Interactions chimiques entre les ions métalliques et les groupements fonctionnels des EPS au sein du biofilm [78].

La séquestration d'ions métalliques par les EPS, en particulier des ions calcium, réduit leur concentration en solution : la formation d'EPS inhibe donc dans ce cas la précipitation de carbonate de calcium [77]–[79]. Toutefois, l'adsorption des ions calcium aux EPS transforme le biofilm en « pompe à calcium » : dans un milieu continuellement approvisionné en ions calcium, la séquestration des ions calcium par les EPS est compensée par l'arrivée d'autres ions calcium issus du milieu environnant [67]. Une diminution de la capacité d'adsorption du biofilm peut alors favoriser la précipitation de carbonate de calcium, à travers la libération d'ions calcium dans un environnement déjà concentré. Trois mécanismes sont possibles [57], [80] :

- Lorsque les groupements fonctionnels séquestrant les ions sont détruits par la biodégradation des EPS, la libération d'ions calcium et la formation d'ions carbonate conduit à la précipitation de carbonate de calcium (Figure 24). Dans cette situation, la formation de calcite se fait par cycles de production-dégradation du biofilm, formant des strates de calcite à mesure que le biofilm séquestre puis relargue du calcium ;

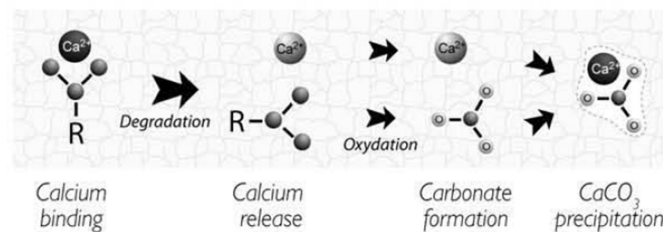


Figure 24 : Biominéralisation induite par la dégradation des EPS [57].

- La matrice du biofilm, en limitant la diffusion de l'eau et de ses solutés, forme des microenvironnements souvent plus riches en ions. Sa déshydratation provoque une sursaturation en ions, suivie par leur précipitation. Au bout de plusieurs cycles d'hydratation/déshydratation, il se forme une structure stratifiée similaire à celle obtenue par dégradation des EPS [57] ;
- La réorganisation des EPS peut conduire deux groupements fonctionnels, chacun chargé d'un ion calcium, à se « partager » un seul ion calcium, provoquant alors la libération du deuxième ion calcium (Figure 25). L'augmentation de la concentration en ions calcium libres peut alors provoquer la précipitation de carbonate de calcium.

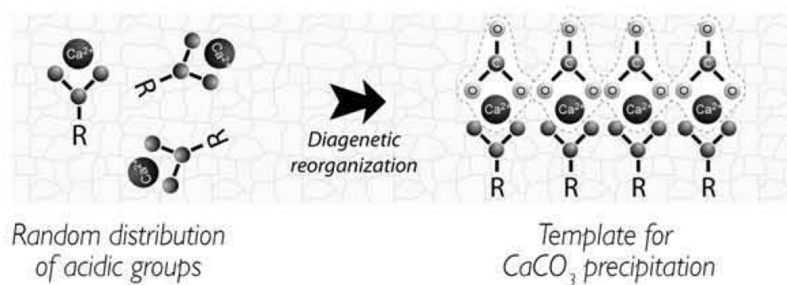


Figure 25 : Biominéralisation induite par réorganisation des EPS [57].

Ces mécanismes sont considérés comme les principales causes de biominéralisation au sein des biofilms, mais d'autres facteurs peuvent intervenir :

- Les biofilms constituent des sites de nucléation importants pour la précipitation de minéraux. De fait, de nombreux chercheurs ont constaté que les cristaux sont physiquement associés aux EPS dans les biofilms, ce qui révèle leur formation au sein même du biofilm [67] ;
- Les EPS peuvent favoriser indirectement l'accumulation de CaCO_3 en évitant aux bactéries de s'auto-emmurer et de mourir [4], [67]. En prolongeant ainsi la survie des bactéries, les EPS augmentent leur potentiel de biominéralisation sur le long terme ;
- La diffusion des gaz étant plus difficile au sein du biofilm que dans l'eau, un biofilm épais peut limiter les échanges de gaz entre les bactéries et le milieu extérieur, ralentissant ainsi la biominéralisation en profondeur.

Les biofilms sont donc des structures complexes, dont la nature chimique et la structure, couplés aux conditions environnementales, peuvent favoriser comme inhiber la précipitation de CaCO_3 . Les facteurs influençant ces paramètres étant encore peu connus, il est difficile de prévoir l'impact de la formation de biofilm sur la précipitation de carbonates. En effet, en plus d'avoir un impact sur la quantité de CaCO_3 produit, la nature des EPS a un rôle important dans la forme et la nature des cristaux : la structure de la matrice confère aux cristaux des formes spécifiques [57], et sa composition chimique peut induire la formation de cristaux de nature différente (aragonite, vaterite, dolomite) [67].

1.2.4. Morphologie du carbonate de calcium biosourcé

Le processus de biominéralisation du carbonate de calcium donne essentiellement lieu à la formation de calcite. Il existe cependant une diversité importante de cristaux de carbonate de calcium, qui peuvent être différents par leur morphologie mais aussi par leur forme cristalline, par leur degré d'hydratation voire par leur composition. Il existe en effet plusieurs formes de carbonate de calcium : celui-ci peut être anhydre et se présenter sous la forme de calcite, de vaterite ou d'aragonite. Il peut aussi être monohydraté (monohydrocalite), pentahydraté (ikaite) ou encore amorphe (Figure 26) [71]. De toutes ces formes, Il est possible de distinguer le type de précipité obtenu par plusieurs méthodes, les plus courantes étant l'analyse cristallographique par DRX et l'observation directe au MEB, les précipités présentant des formes et des tailles bien distinctes (Figure 26).

La biominéralisation conduit le plus souvent à la production de calcite : c'est en effet non seulement le minéral biosourcé le plus répandu dans la nature mais aussi le plus stable et durable, et donc celui qui présente le plus d'intérêt pour des applications en génie civil. Les microorganismes peuvent toutefois précipiter une grande diversité de carbonate de calcium ainsi que d'autres types de minéraux [81]. La nature des minéraux précipités peut varier en fonction de la souche étudiée et de la composition du milieu et de nombreux facteurs, comme le pH, la sursaturation, la composition de la paroi cellulaire, les composés organiques dissous, les composés organiques solides (EPS et biofilm notamment) [57], [71]. Les mécanismes déterminant la nature et la morphologie des microbialites (minéraux formés par un processus biologique) sont de fait très complexes et ne sont pas totalement élucidés, d'autant qu'ils impliquent des microenvironnements d'échelle souvent inférieure au micromètre.

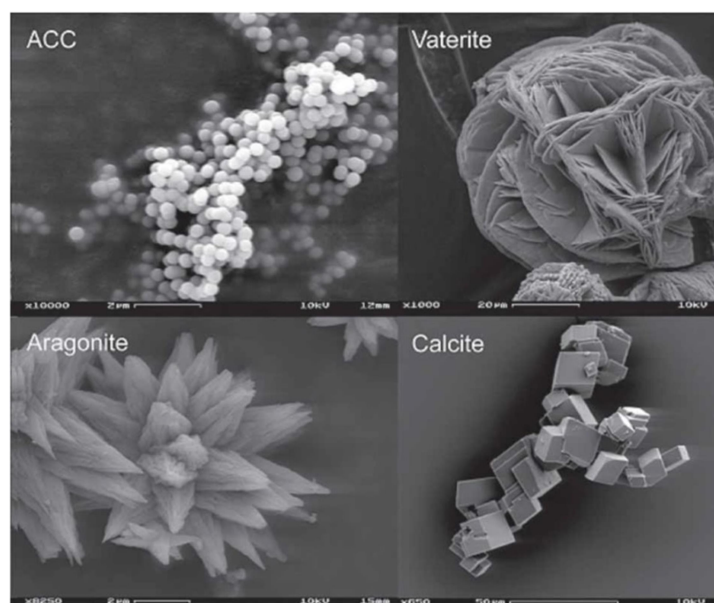


Figure 26 : Clichés par MEB de cristaux de carbonate de calcium sous différentes morphologies (ACC : carbonate de calcium amorphe) [71].

De nombreux travaux de recherche font état de la diversité des minéraux produits. Rodriguez-Navarro *et al.* (2007) [82] observent la production de vaterite par la souche bactérienne *Myxococcus xanthus* et constatent que la vaterite biosourcée est différente de la vaterite d'origine abiotique : les cristaux sont agglomérés en sphérulites (sphères formées par l'aggrégation de cristaux) et non pas en

roses des sables. En outre, la vaterite biosourcée est plus stable que la vaterite d'origine purement minérale, cette dernière se transformant spontanément en calcite en milieu aqueux. Rivadeneyra *et al.* (1998) [83] ont observé la production d'aragonite, de dolomite ainsi que de monohydrocalcite, en général sous forme de sphérulites, par la souche bactérienne *Halomonas eurihalina*. Cette diversité a été observée dans de nombreux travaux, révélant que la calcite n'est que rarement l'unique précipité formé par les microorganismes étudiés bien qu'elle soit dans la plupart des cas le composé majoritaire, et que sa teneur augmente avec le temps par transformation de composés moins stables en calcite [71], [84]. C'est par exemple le cas du carbonate de calcium amorphe, qui se transforme spontanément en vaterite puis en calcite.

Outre la formation de différents types de carbonate de calcium, la calcite précipitée par l'activité microbienne peut être difficile à identifier par observation directe, ses formes pouvant grandement différer de la forme rhomboédrique typique de la calcite formée par minéralisation abiotique. Dupraz *et al.* (2009) [57] répertorient cinq formes de microbialites de carbonate de calcium pouvant être de la calcite ou non : rhomboédrique à bords chanfreinés, aiguilles, haltères, sphérulites (Figure 27), ou encore sphéroïdes d'échelle nanométrique (carbonate de calcium amorphe) (Figure 26). La diversité réelle des microbialites de carbonate de calcium est potentiellement plus vaste encore, des cristaux de vaterite ayant été observés en laboratoire avec des formes de tores, de fleurs, d'éponges voire de gâteau ou d'œuf au plat [82]. Jones et Peng (2014) [85] font état de nanodendrites de calcite assemblées pour former des filaments, des dendrites, des rhomboèdres creux ou des cristaux triradiés (Figure 27). Les sphérulites représentées sur la Figure 27 semblent résulter du même processus d'addition de cristaux rhomboédriques en formes complexes. Dans certains cas, les amas de carbonate de calcium peuvent être formés de nanoparticules de carbonate de calcium amorphe, ce qui rend difficile son identification sans analyse EDS (Figure 28) [86].

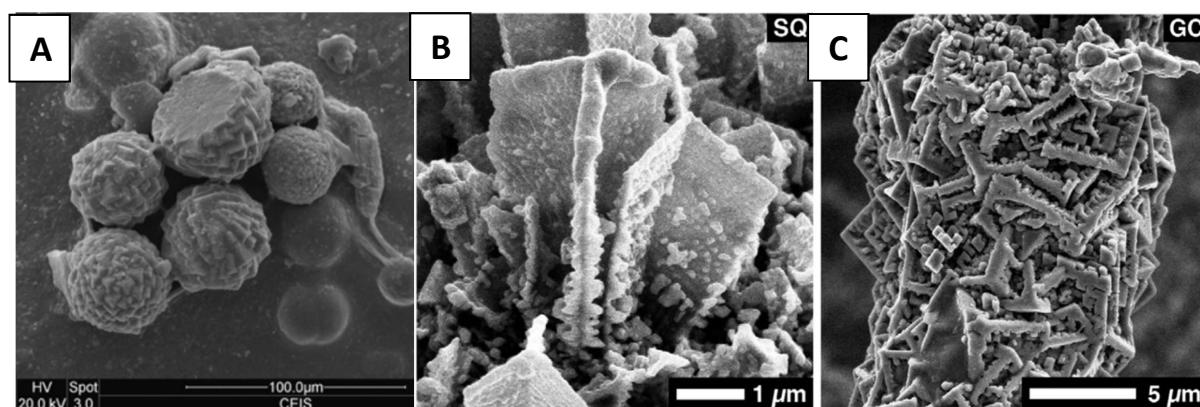


Figure 27 : A– Sphérulites de biocalcite [87]. B – cristaux triradiés de biocalcite [85]. C – cristaux rhomboédriques creux de biocalcite [85].

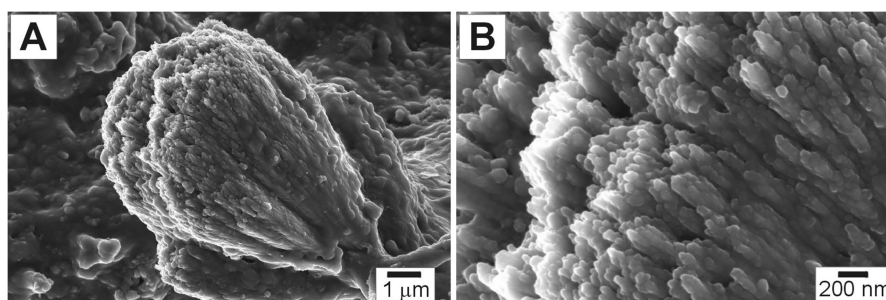


Figure 28 : Amas de carbonate de calcium biosourcé, formé par agrégation de nanoparticules de carbonate de calcium amorphe [86].

Au sein de fissures ayant subi un traitement de biocicatrisation, la calcite d'origine minérale peut être difficile à différencier de la biocalcite puisque les deux peuvent présenter une morphologie similaire. Dans ce cas, la biocalcite peut être reconnue par le biais des empreintes laissées par les bactéries dans les cristaux. En effet, la biocalcite forme au fur et à mesure de sa formation une gangue autour des bactéries [58]. Ces gangues sont parfois incomplètes et il est alors possible d'observer une empreinte du microorganisme dans le microbialite. Ces empreintes témoignent de l'origine biologique du cristal observé et permettent de confirmer que le processus de biominéralisation a bien eu lieu. Castanier *et al.* (1999) [58], Kaur *et al.* (2013) [88], Bang *et al.* (2001) [89] et Sangadji *et al.* (2017) [90] sont parvenus à observer ces traces au cours d'essais de biominéralisation *in vitro* (Figure 29).

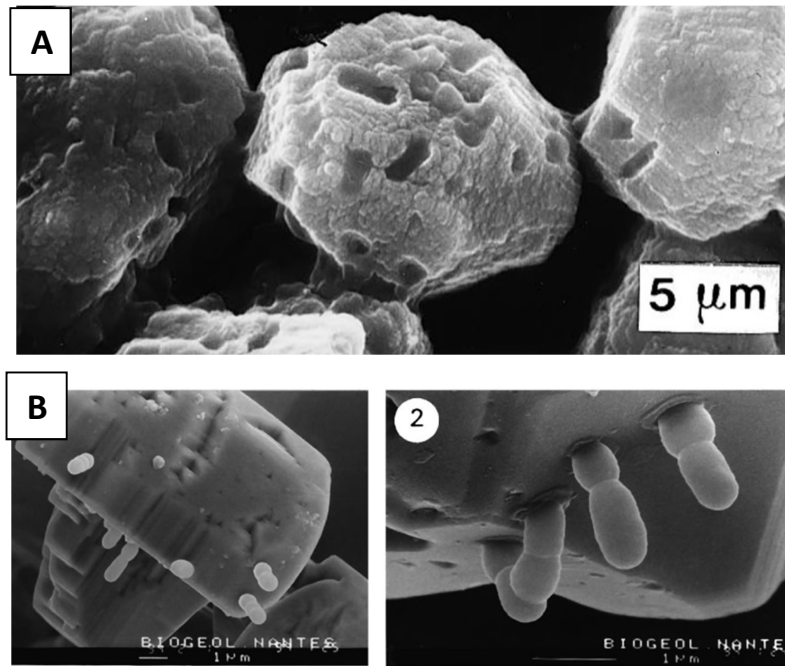


Figure 29 : A – Cristaux de calcite présentant des empreintes de bactéries. B – Bactéries émergeant du cristal en formation [58].

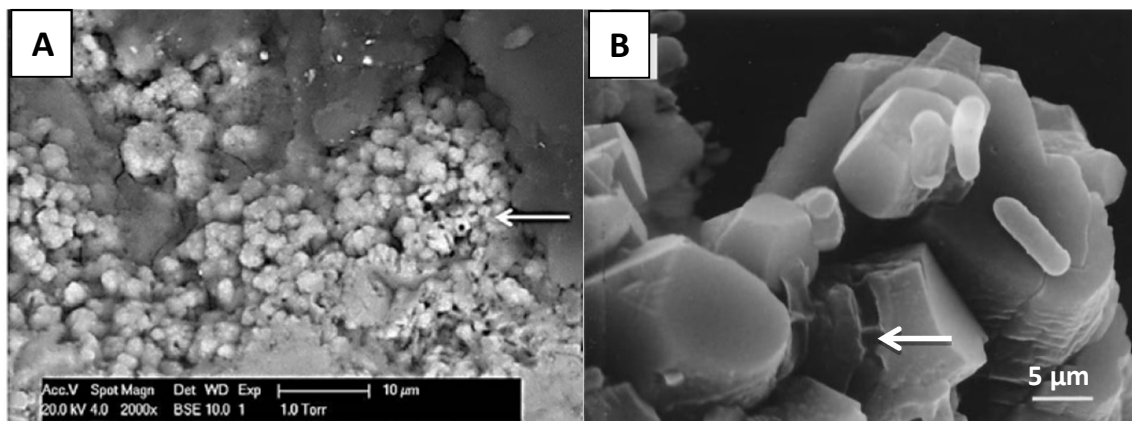


Figure 30 : Observations au MEB. A – Couche de calcite présentant des empreintes de bactéries (flèche) [90]. B - Cristaux de calcite surmontés de bactéries, présentant des empreintes de bactéries (flèche) [89].

1.3. Biocicatrisation des matériaux cimentaires

1.3.1. Intérêt pour le génie civil

Malgré le fort potentiel des bioprocédés pour la réduction de l'impact environnemental des activités humaines, il y a encore peu d'applications des biotechnologies au génie civil et le monde vivant est plus généralement perçu comme un ennemi des ouvrages en béton. En effet, nombre de microorganismes participent à leur détérioration physique (croissance d'hyphes ou de rhizoïdes dans les fissures) ou chimique (certaines bactéries et champignons peuvent produire des substances agressives comme des acides organiques ou de l'acide sulfurique, qui attaquent le matériau) [16]. Toutefois, la capacité de microorganismes à produire des minéraux par le processus de biominéralisation présente un intérêt particulier pour le génie civil, dans la mesure où la bioproduction de carbonate de calcium peut permettre la réparation et la conservation de bâtiments.

Le carbonate de calcium, en particulier la calcite, possède un potentiel intéressant pour le génie civil de par sa nature même. En effet, la calcite est un matériau durable, présentant une bonne adhérence à l'ouvrage et une bonne résistance mécanique. En outre, sa couleur blanche nuit moins à l'esthétique de l'ouvrage que les composés synthétiques et peut être mise à profit pour réaliser une patine sur un ouvrage, une application proposée par la société Amonit [91]. La calcite entre dans la composition de quasiment tous les matériaux de construction minéraux, qu'il s'agisse d'ouvrages anciens (pierre calcaire) ou modernes (par carbonatation de l'hydroxyde de calcium des ouvrages en matériaux cimentaires).

A travers le processus de biominéralisation, il devient en théorie possible de produire de la calcite où on le souhaite et ainsi de réaliser les opérations de maintenance et de réparation des ouvrages sans avoir recours à des composés synthétiques ayant un fort impact environnemental. Ainsi, plusieurs utilisations de la biocalcite pour le génie civil sont actuellement en cours de développement.

On distinguera trois types d'utilisation du phénomène de biocicatrisation en génie civil :

- *La biodéposition*, qui consiste à créer une couche protectrice sur la surface d'un bâtiment. Ce type d'intervention concerne surtout les ouvrages en pierre, peu sensibles à la fissuration mais beaucoup plus sensibles aux dégradations de surface ;
- *L'autobiocicatrisation*, qui consiste à introduire des bactéries sporulées dans le mélange cimentaire au moment de la construction de l'ouvrage. Les bactéries font alors partie intégrante du matériau ;

- *L'exobiocicatrisation*, qui consiste à appliquer des bactéries viables à l'intérieur de fissures déjà formées. Les bactéries se développent au sein de la fissure en produisant du CaCO_3 , refermant ainsi la fissure. Dans ce cas, le matériau lui-même ne contient pas de bactéries.

1.3.2. La biodéposition

La biodéposition de calcite est actuellement la seule méthode de bioproduction de CaCO_3 ayant été commercialisée pour le génie civil. Des brevets ont été déposés dès les années 1990 [92]–[94] : en appliquant une culture de bactéries sédimentaires sur un ouvrage de pierre, un dépôt de calcite d'apparence similaire au matériau sous-jacent est réalisé en surface. Ce traitement réduit la porosité de surface du matériau, ralentissant ainsi son vieillissement sans nuire à son esthétisme. Dans leurs travaux, Le Métayer-Levrel *et al.* (1999) [92] proposent plusieurs techniques d'application des bactéries sur le matériau pour effectuer une biodéposition à sa surface (Figure 31) :

- La protection de surface de bâtiments par pulvérisation directe d'une suspension bactérienne sur la surface à traiter, suivie par une pulvérisation régulière de solution nutritive permettant la biominéralisation. Cette technique est actuellement commercialisée par la société française Amonit sous le nom de produit CALCITE[®] [91] ;
- Le traitement des surfaces par badigeonnage d'un mélange de poudre de craie et de « crème bactérienne » (une suspension bactérienne très concentrée s'apparentant à une pâte). La surface traitée est ensuite imprégnée de solution nutritive pour permettre la biominéralisation ;
- La protection et la coloration de bâtiments par la formation d'une patine de calcite contenant des pigments. Cette méthode est mise en œuvre de la même manière que la protection de surface par pulvérisation, mais des pigments sont ajoutés à la suspension dans le but de colorer la couche de biocalcite formée et lui ajouter une valeur esthétique. Cette technique est actuellement commercialisée par la société Française Amonit sous le nom de produit CALCITE[®] BIOPATINE [91].

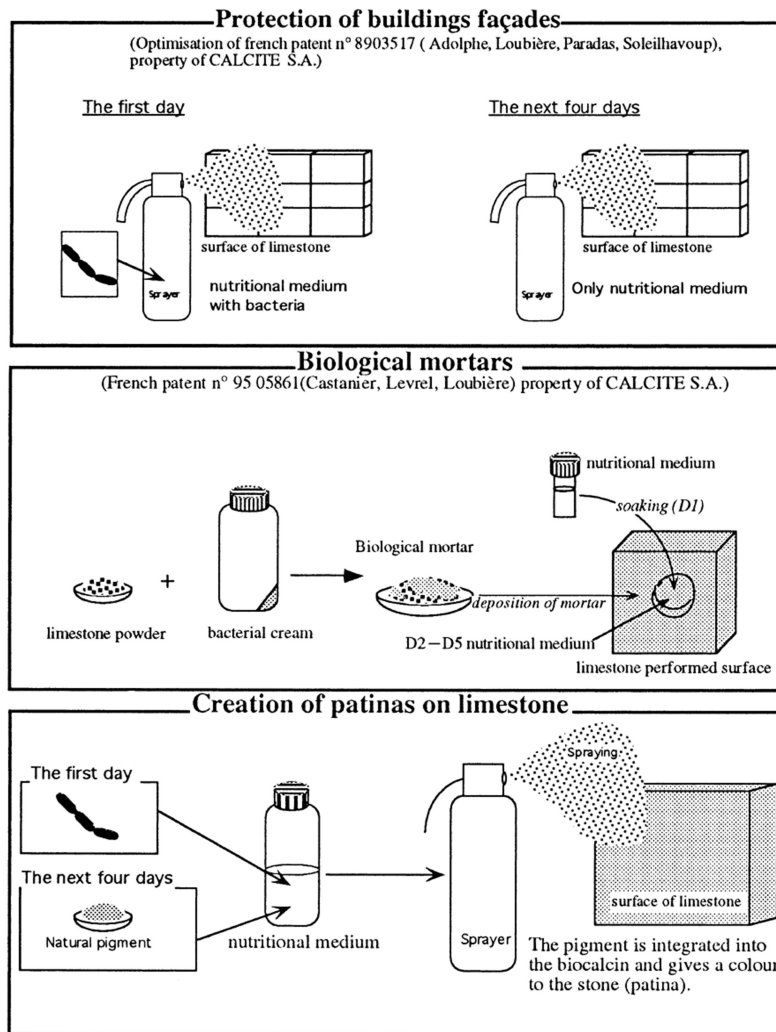


Figure 31 : Proposition de différentes méthodes pour l'entretien d'ouvrages de pierre par biodéposition de calcite [92].

Ces techniques sont essentiellement destinées aux ouvrages en pierre calcaire [95], [96], mais elles sont aussi applicables aux matériaux cimentaires. La plupart des travaux de recherche effectués étudient la biodéposition sur des échantillons directement immergés dans la suspension bactérienne [69], [95], [97]–[100], mais certaines études envisagent des approches différentes.

Immobilisation en gel d'Agar : Wang *et al.* (2011) [101] ont traité des mortiers par le biais d'une suspension semi-solide mêlant nutriments, agar et bactéries. La suspension a été appliquée par brossage sur le matériau (Figure 32), puis les mortiers traités ont été curés une semaine à température ambiante. L'utilisation d'Agar a pour objectif de pallier la sédimentation et le dessèchement de la suspension bactérienne, principaux inconvénients liés à l'utilisation directe de bactéries dans un milieu liquide. En effet, en utilisant un milieu liquide, il peut se produire une

sédimentation des bactéries après application, conduisant à une hétérogénéité de la couche de calcite formée. Il est en outre nécessaire de faire des apports réguliers d'eau quand un milieu liquide est utilisé, ce que l'Agar n'exige pas puisqu'il immobilise l'eau, les bactéries et le milieu. Pour des échantillons ayant une absorption capillaire initiale de 24 %, les essais réalisés ont permis de réduire cette valeur à 6 %, contre 16 % quand les mortiers sont traités avec un milieu liquide, témoignant de l'intérêt du concept.

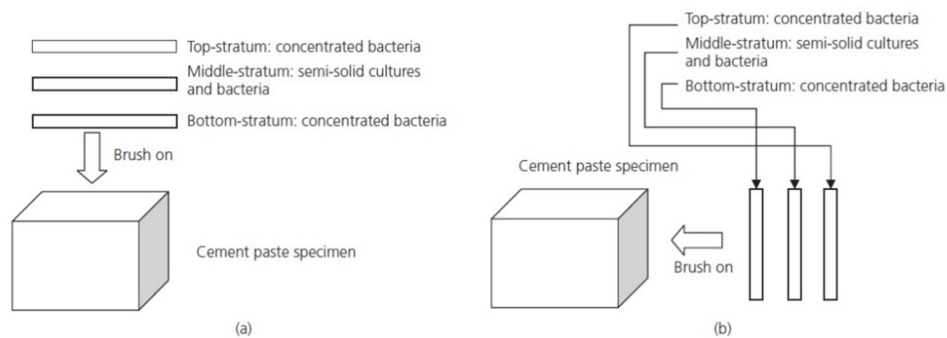


Figure 32 : Procédé de biodéposition par brossage de suspensions bactériennes semi-solides [101].

En plus d'offrir des possibilités de préservation des ouvrages, la biominéralisation peut être employée pour faciliter l'emploi des granulats de béton recyclés (GBR). Il est en effet possible de concasser le béton d'ouvrages démolis pour utiliser ces débris comme granulats à incorporer dans la pâte cimentaire lors de la préparation de bétons, ce qui pourrait réduire le volume de déchets de béton à traiter. Ces granulats recyclés ont cependant une très forte capacité d'absorption d'eau et une faible adhésion à la matrice cimentaire, ce qui d'une part réduit la quantité d'eau libre dans la pâte cimentaire et nuit à son ouvrabilité, et d'autre part réduit la résistance mécanique du matériau durci. Une étude par Grabiec *et al.* (2012) [102] montre que la biodéposition de CaCO_3 à leur surface permet de limiter ces difficultés d'utilisation puisque le processus réduit fortement leur capacité d'absorption d'eau (Figure 33) et améliore leur adhérence vis-à-vis du liant. L'utilisation de chlorure de calcium comme source de calcium dans cette étude soulève néanmoins des questionnements sur la durabilité d'un béton incorporant du GBR traité par cette méthode. L'ajout de CaCl_2 peut en effet entraîner une forte concentration en ions chlorure dans le matériau et favoriser ainsi la corrosion des barres d'armature en acier.

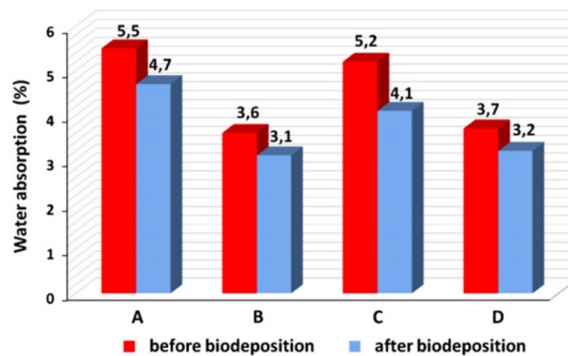


Figure 33 : Réduction de la capacité d'absorption de l'eau de GBR par biodéposition de calcite, pour des mortiers de rapport E/C et de granulométries différentes [102].

1.3.3. Autobiocicatrisation des matériaux cimentaires

L'autobiocicatrisation des matériaux cimentaires consiste à prévenir la formation des fissures, en conférant au matériau une capacité de réparer lui-même ses fissures lors de leur apparition. Les bactéries sont dans ce cas ajoutées au mélange cimentaire lors de la préparation du matériau, à la manière d'un ajout cimentaire. Une fois le béton mis en place, les bactéries, dispersées dans le matériau, y sont emprisonnées jusqu'à sa fissuration. Lors de l'apparition d'une fissure, l'entrée d'eau et la diffusion de nutriments crée un environnement favorable au développement bactérien : les bactéries se multiplient pour atteindre une taille de population active capable de générer du carbonate de calcium. Cette approche préventive présente comme principal atout la suppression, ou au moins la réduction, des opérations d'entretien sur l'ouvrage : tant que l'ouvrage conserve une capacité d'autobiocicatrisation suffisante, le diagnostic et la réparation des fissures n'est plus nécessaire, ce qui réduit les coûts liés à ces opérations. En outre, cette capacité s'applique aux fissures non accessibles pour les techniques de réparation conventionnelles, ce qui améliore la durabilité de l'ouvrage. Le principe même de l'autobiocicatrisation sous-tend cependant ses limites :

- D'une part, seuls les ouvrages construits à partir de bétons capables d'autobiocicatrisation sont dotés de cette capacité, puisque l'introduction des bactéries doit avoir lieu durant la préparation du béton.
- D'autre part, la capacité d'autobiocicatrisation de ces ouvrages est finie. En effet, les réserves de précurseurs et la population de bactéries vivantes s'amenuisent avec le temps, étant sollicitées à chaque fois qu'une fissure se forme.

L'autobiocicatrisation des ouvrages en matériaux cimentaires est donc limitée par le surcoût qu'elle entraîne pour leur construction, et par la diminution de son efficacité au cours du vieillissement de l'ouvrage. En outre, elle est définitivement inapplicable pour tous les autres ouvrages. De nombreuses études cherchent à maximiser le potentiel de cette méthode à travers différentes approches : introduction de bactéries végétatives ou sporulées, protection des bactéries par immobilisation et diversification des souches bactériennes utilisées.

1.3.3.1. Introduction de bactéries libres

La méthode la plus simple est l'introduction directe des bactéries dans le mélange. Toutefois, le potentiel d'autobiocicatrisation ne se maintient pas longtemps en l'absence d'un support protégeant les bactéries du matériau lui-même. En effet, même sous forme de spores, la durée de vie des bactéries dans le matériau ne dépasse pas quelques mois, en raison de la forte alcalinité du milieu et de l'écrasement des bactéries lors de la prise du ciment, les pores du matériau se rétrécissant jusqu'à moins de 1 μm [103].

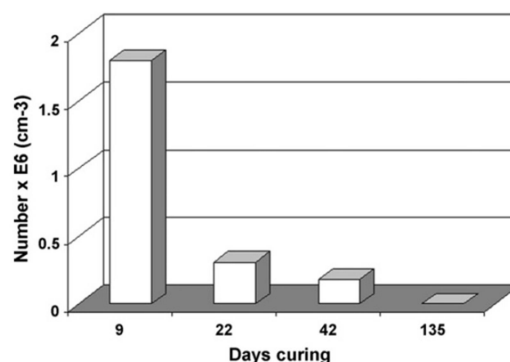


Figure 34 : Evolution du nombre de bactéries viables dans le matériau au cours du temps [103].

En ajoutant des bactéries sous forme végétative au mélange lors de la préparation du béton, Luo *et al.* (2015) [104] sont parvenus à un colmatage total des fissures faisant jusqu'à 300 μm pour des échantillons de béton ayant été fissurés par compression après moins de 14 jours de cure. La capacité de cicatrisation diminue toutefois rapidement et n'est plus que de 60 μm pour des échantillons ayant été fissurés après 60 jours de cure. L'autocicatrisation abiotique n'ayant pas été prise en compte dans cette étude, il est toutefois impossible de connaître la part réelle de l'activité bactérienne dans les résultats obtenus.

Dans une étude de 2016 [105], ces auteurs s'intéressent à l'adjonction de spores avec différents précurseurs de biominéralisation : le nitrate, le lactate et le formate de calcium. Le mélange spores-précurseur est ajouté à hauteur de 1, 2 ou 3 % de la masse du mélange cimentaire pour étudier leur effet sur le matériau. Ces essais montrent que la nature du précurseur utilisé a un impact sur le matériau lui-même : à partir de 2 %, le nitrate de calcium réduit de 20% la résistance en compression du matériau, tandis que les autres composés n'ont pas d'impact sur sa résistance en compression. Tous les précurseurs testés ont toutefois un impact sur la mise en place du matériau, puisqu'ils fluidifient la pâte cimentaire et retardent le temps de prise finale. Xu *et al.* (2014) [106] fabriquent des mortiers comprenant 1 % de mélange à base d'extrait de levure, de précurseur de biominéralisation (lactate ou glutamate de calcium) et de bactéries (souche non précisée), puis ces mortiers sont fissurés par compression. Après 30 jours d'immersion, une couche de calcite et de vaterite recouvre quasiment toute la surface de fissures d'environ 200 µm d'ouverture initiale. L'introduction de lactate de calcium dans le matériau n'a pas d'impact significatif sur sa résistance en compression, mais le glutamate de calcium semble la réduire faiblement.

Jonkers et Schlangen (2008) [107] réalisent des essais similaires en préparant des mortiers contenant 0,5 % de lactate de calcium et des spores de *Bacillus cohnii*, fissurés après 28 jours de cure puis immergés dans l'eau durant 10 jours. Le taux de colmatage de la fissure n'est pas mesuré mais les auteurs observent la formation de sphérulites de calcite dans les fissures des mortiers contenant des bactéries. L'introduction du précurseur de biominéralisation et des bactéries provoque néanmoins une diminution d'environ 10 % de la résistance en compression du mortier. Les auteurs étudient donc l'impact de différents précurseurs et nutriments sur les performances mécaniques du matériau (Figure 35), et constatent que ces ajouts diminuent la répétabilité des performances mécaniques, avec un effet positif ou négatif en fonction du composé utilisé. Les plus utilisés, à savoir l'urée, le lactate et le glutamate de sodium, ont peu d'impact sur la résistance du mortier à la traction.

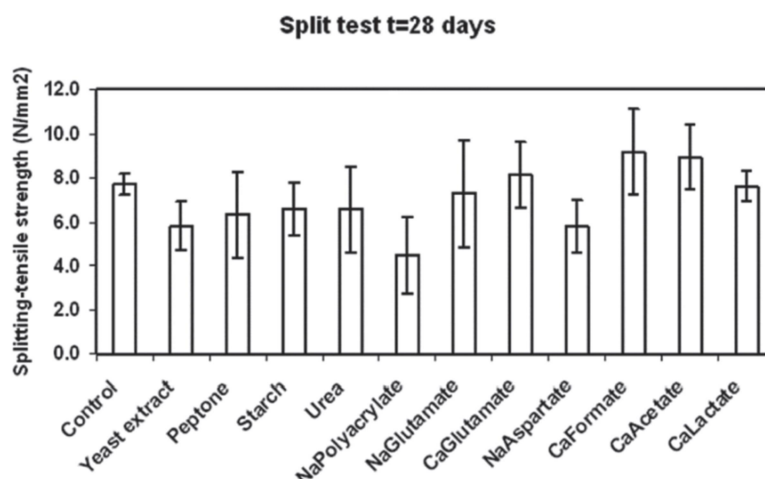


Figure 35 : Impact de l'introduction de 0,5 % de différents précurseurs carbonatés sur la résistance du mortier à la traction [107].

Malgré son importance, la survie à long terme des bactéries dans le matériau est souvent négligée, les études étant réalisées en général sur des échantillons à 28 jours [108]. Dans certains cas, les bactéries sont ajoutées sous forme végétative, afin d'améliorer la résistance et la perméabilité du béton sans qu'une capacité d'autobiocicatrisation ne soit recherchée [109]–[113]. Afin d'augmenter la durée de vie des bactéries dans le matériau et augmenter la quantité de milieu disponible pour leur développement, les dernières études ont porté sur l'immobilisation des bactéries en employant des milieux de culture non conventionnels.

1.3.3.2. Introduction de bactéries immobilisées

L'immobilisation de bactéries est une technique très étudiée pour réaliser des cultures dans des environnements non conventionnels et peut reposer sur différents mécanismes, notamment l'encapsulation des microorganismes, leur adsorption sur un support, ou leur autoencapsulation. L'immobilisation des bactéries, bien qu'elle puisse ralentir leur croissance, favorise leur survie à court et à long terme en les protégeant contre l'environnement hostile qu'est le béton.

Trois méthodes d'encapsulation des bactéries ont été testées dans le cadre de la biocicatrisation des matériaux cimentaires : l'encapsulation dans des microcapsules de mélamine, d'alginate de sodium modifié et d'hydrogel de silice. L'encapsulation favorise la survie à long terme des bactéries en les isolant du matériau, les bactéries n'étant libérées que lorsque la fissuration du

matériau brise les capsules qui y sont disséminées. Wang *et al.* (2014) [114] utilisent des spores de *Bacillus sphaericus* encapsulées dans des sphères de mélamine de 1 à 5 μm de diamètre, qui sont mises en suspension et incorporées au mélange cimentaire lors du malaxage du mortier. Le mélange nutritif à base d'extrait de levure, d'urée et de nitrate de calcium est ajouté séparément au mélange cimentaire.

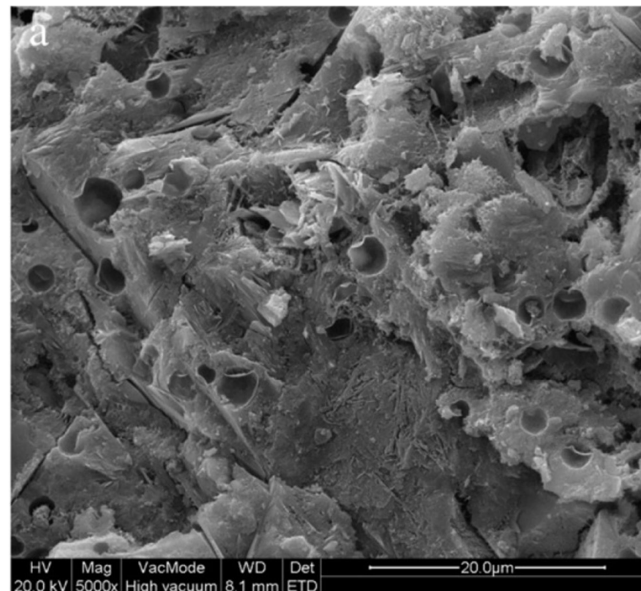


Figure 36 : Empreintes sphériques des microcapsules brisées dans un mortier fissuré [114].

L'addition de microcapsules inoculées permet de complètement colmater au bout de 8 semaines de traitement des fissures d'ouverture initiale allant jusqu'à 970 μm d'ouverture, contre 250 μm pour les échantillons ne contenant pas de bactéries (Figure 37). Il apparaît que les conditions d'hygrométrie lors du stockage des échantillons après fissuration ont un fort impact sur les résultats : les meilleurs résultats ont été obtenus en soumettant les échantillons à des cycles de mouillage-séchage, tandis qu'une conservation à sec à 95 % d'humidité n'a pas permis d'obtenir une réduction d'ouverture des fissures pour aucun des échantillons. L'ajout de nutriments dans l'eau destinée à immerger les fissures ne semble en revanche pas avoir d'impact sur les résultats. Toutefois, l'introduction de capsules dans le mortier a engendré la perte de 15 à 34 % de la résistance en compression des échantillons, cette perte allant jusqu'à 47 % lorsque celles-ci contiennent des nutriments en plus des microcapsules. Il y a donc une influence négative des microcapsules sur la résistance du matériau, celles-ci étant fragiles et représentant donc des points faibles au sein du matériau.

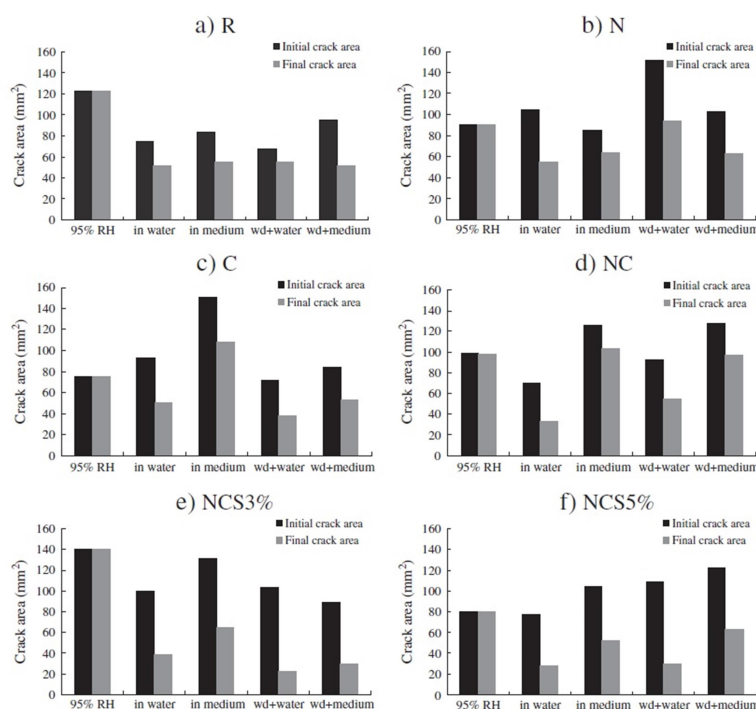


Figure 37 : Réduction de surface d'ouverture de fissures. R – contrôle ; N – nutriments seulement ; C – capsules de mélamine ; NC – capsules et nutriments ; NCS – 3% ou 5% de capsules contenant des bactéries, avec nutriments ; wd – cycles de mouillage-séchage.

Wang *et al.* (2015) [115] se servent d'un gel d'alginate modifié pour préparer des microcapsules de gel sec de 20 à 100 μm de diamètre contenant des spores de la bactérie uréolytique *Bacillus sphaericus*. Les capsules maintenues durant 3 jours dans un milieu nutritif sont recouvertes d'une couche de carbonate de calcium, témoignant du maintien de l'activité bactérienne et de sa capacité de biominéralisation (Figure 38). Toutefois, l'introduction de 1 % de capsules dans le mortier diminue son ouvrabilité de 7 % et sa résistance en compression de 23 %. Le potentiel de biocicatrisation de cette technique n'a pas été mesuré au cours de cette étude. En employant la même méthode, Palin *et al.* (2016) [116] parviennent à produire un dépôt de calcite sur des capsules d'alginate dans un milieu simulant un environnement marin à 8°C, la méthode étant spécifiquement adaptée pour des ouvrages sous-marins. Cette capacité de biominéralisation à basse température est originale et intéressante, car la plupart des souches étudiées à ce jour ont une température d'activité optimale supérieure à 20°C, ce qui limite leur potentiel en climat tempéré. L'introduction de ces capsules au sein de matériaux cimentaires n'est toutefois pas étudiée au cours de cette étude,

l'impact des capsules sur leurs performances mécaniques et leur capacité d'autocicatrisation n'est donc pas connu.

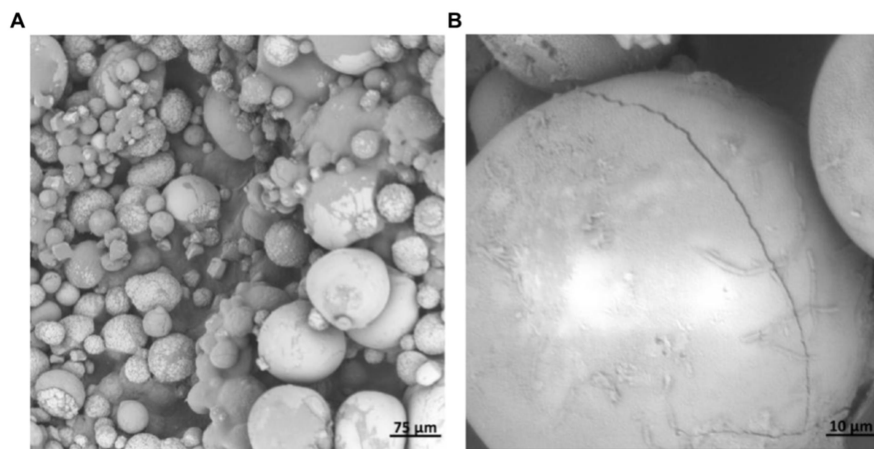


Figure 38 : Capsules d'alginate contenant des bactéries, recouvertes d'une couche de calcite biosourcée, observées au MEB [115].

Les hydrogels de silice peuvent être utilisés pour emprisonner des composés divers dans leur structure, dont des bactéries. Dans une étude de Wang *et al.* (2014) [117], des spores de *Bacillus sphaericus* sont immobilisées au sein d'un gel de silice, qui est ensuite réduit en poudre par broyage cryogénique et lyophilisation. Cette poudre est ajoutée à hauteur de 2 % au mélange cimentaire lors de la préparation des échantillons de mortier. Ce vecteur protège les bactéries de la matrice cimentaire et présente plusieurs avantages par rapport à d'autres méthodes. D'une part, à l'inverse des capsules, il n'est pas impératif que les particules soient rompues pour que les bactéries soient exposées lors de la fissuration. D'autre part, l'hydrogel a une capacité de gonflement et de rétention d'eau importante, qui favorise l'hydratation des grains de ciment anhydres et le développement bactérien dans la fissure. Après 4 semaines de cure en cycles de mouillage-séchage, des fissures de 500 µm d'ouverture initiale sont totalement cicatrisées pour les échantillons contenant les bactéries immobilisées, contre 300 µm pour les témoins stériles. Malgré la forte diminution de perméabilité des mortiers suite à l'autobiocicatrisation, les échantillons contenant l'hydrogel et les bactéries ont en fin de traitement une perméabilité à l'eau (k) 5 à 10 fois supérieure aux témoins. Cette augmentation peut être due à la capacité d'absorption de l'hydrogel, qui gonfle lors de la préparation de la pâte cimentaire et libère l'eau contenue après le durcissement (synérèse), ce qui crée des espaces de vide dans la matrice cimentaire. Bien qu'il n'y ait pas de mesures pour le vérifier, il est possible que ce phénomène nuise à la résistance mécanique du matériau.

L'encapsulation des bactéries pouvant être complexes, plusieurs études se sont intéressées à la possibilité d'immobiliser les bactéries en les imprégnant sur des microparticules, une technique plus simple à mettre en œuvre. Wiktor et Jonkers (2011) [118] ont réalisé des essais de biocicatrisation sur des mortiers dans lesquels ont été introduits 16 % de particules d'argile préalablement imprégnées avec du milieu nutritif et des spores de *Bacillus alkalinitrilicus*, et qui ont été ensuite fissurés par compression. Les auteurs observent une cicatrisation complète de fissures de largeur allant jusqu'à 460 µm contre 180 µm pour les témoins abiotiques après 100 jours d'immersion dans de l'eau douce. Les échantillons bactériens présentent après traitement d'importantes concrétions de carbonate de calcium localisées à l'entrée des fissures. Ces concrétions sont absentes des témoins, témoignant d'un rôle biologique dans leur formation. Ces résultats sont complétés par ceux de Jonkers *et al.* (2011) [119] : pour des échantillons stockés 6 mois avant fissuration, la viabilité des bactéries sur les particules d'argiles reste proche de 100 %, ce qui suggère une capacité d'autocicatrisation à long terme au matériau. Toutefois, l'ajout de particules d'argile en grandes quantités a entraîné une perte de 50 % de la résistance en compression du matériau. Koster *et al.* (2015) [120] ont évalué une méthode proche de celle de Wiktor et Jonkers (2011) [118], consistant en l'utilisation de bactéries enrobées dans un polymère à base de métakaolin, l'ensemble formant des microparticules composites. L'incorporation de ces particules dans le matériau n'a pas d'impact sur sa résistance en compression, celle-ci restant comprise entre 25 et 30 MPa pour tous les échantillons. Toutefois, le potentiel de biocicatrisation de cette méthode n'a pas été mesuré au cours de cette étude.

Wang *et al.* (2012) [121] réalisent l'immobilisation de *Bacillus sphaericus* sur des particules de terre de diatomée, qui sont ensuite ajoutées au mélange cimentaire. Sur des échantillons fissurés par flexion, l'introduction de 1 % de terre de diatomée imprégnée de bactéries avec 1 % d'un mélange d'urée et d'extrait de levure permet une cicatrisation totale de fissures jusqu'à 170 µm d'ouverture initiale après 40 jours d'immersion dans une solution contenant de l'urée et du nitrate de calcium. L'étude est toutefois incomplète, puisque ni la durée de survie des bactéries dans la matrice ni l'impact de la méthode sur les performances mécaniques du matériau n'ont été évaluées. La précipitation de carbonate de calcium dans les fissures est avérée, mais il est nécessaire que la fissure soit immergée dans le milieu nutritif à base d'urée et de nitrate de calcium pour que cette précipitation soit significative et conduise au colmatage des fissures. Les auteurs estiment que l'utilisation de cette méthode entraînerait un surcoût de 20 % au prix du matériau, la quantité de terre de diatomées qu'il est possible d'ajouter étant limitée puisque ces dernières réduisent l'ouvrabilité de la pâte de par leur forte capacité d'absorption d'eau.

Des grains d'argile expansée (Ceramsite) sont employés par Chen *et al.* (2016) [122] pour y adsorber des cellules de *Bacillus mucilaginous* (Figure 39), puis les grains imprégnés sont incorporés dans le mortier à hauteur de 8 % de la masse de pâte cimentaire. Après 28 jours de cure humide, les prismes de mortier sont fissurés par flexion et l'ouverture des fissures est ajustée en forçant des clous de diamètre adapté dans les fissures. Après 21 jours d'immersion dans l'eau, une couche de calcite s'est formée à l'intérieur des fissures, et la perméabilité à l'eau des fissures est réduite de 8.10^{-5} à 8.10^{-8} m.s⁻¹, tandis que les échantillons ne contenant pas de bactéries ont une perméabilité finale comprise entre 5.10^{-6} et 1.10^{-5} m.s⁻¹. L'étude ne donne toutefois pas d'informations sur l'épaisseur de la couche de cicatrisation formée.

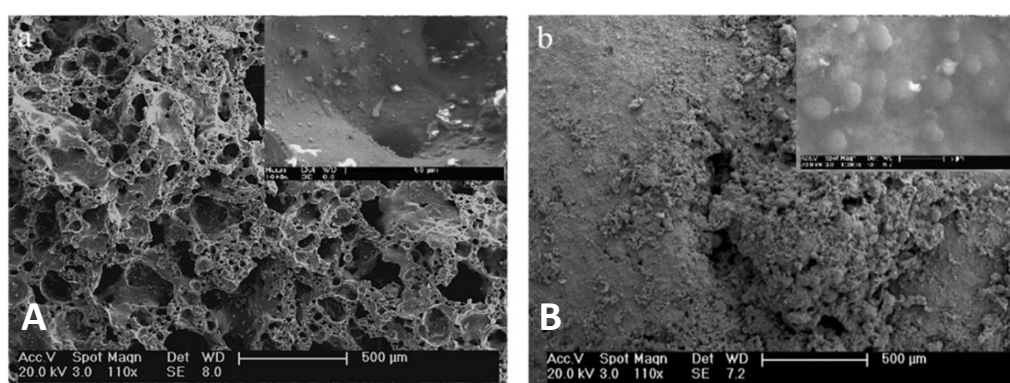


Figure 39 : Surface d'une bille de Ceramsite avant (A) et après (B) imprégnation dans une culture bactérienne [122].

Ersan *et al.* (2015) [123] réalisent une étude comparative entre différentes techniques d'autobiocicatrisation en évaluant notamment l'impact de l'introduction de l'agent de biocicatrisation sur les performances mécaniques d'un mortier préparé à base de ciment classique. Les auteurs comparent l'introduction de spores de *Bacillus sphaericus* et de *Diaphorobacter nitroreducens*, pour six approches d'immobilisation différentes : terre de diatomée, métakaolin, argile expansée, charbon actif, zéolite et entraînement d'air. Il observe que la perte de résistance en compression accompagnant l'ajout d'agent de réparation est principalement due à la nature de la souche bactérienne, tandis que le support lui-même joue un rôle moins important. En effet, l'introduction de *Bacillus sphaericus* a un effet négatif sur le temps de prise et la résistance en compression, entraînant un retard de prise allant jusqu'à 340 minutes et une perte de résistance à 28 jours allant jusqu'à 68 %, tandis qu'aucun effet délétère n'a été observé avec *Diaphorobacter nitroreducens* (Figure 40).

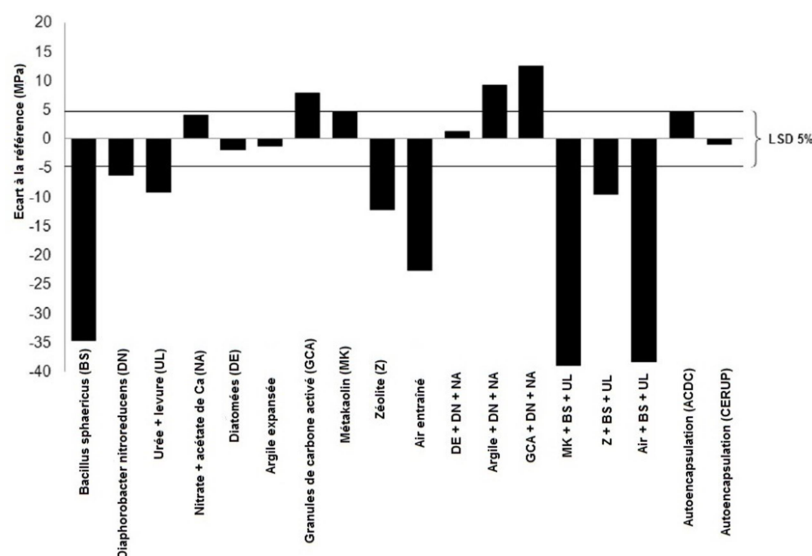


Figure 40 : Résistance en compression à 28 jours sur des mortiers à base de ciment classique, selon la technique d'autobiocicatrisation employée [123].

Des travaux complémentaires de Ersan *et al.* (2016) [72] quantifient le potentiel de biocicatrisation de *P. aeruginosa* et *D. nitroreducens* immobilisées sur des granules de charbon actif ou sur des particules d'argile expansée [72]. Après imprégnation par saturation sous vide, les particules sont introduites dans le mélange cimentaire à hauteur de 5 %. Le matériau est par la suite curé durant 28 jours, puis fissuré et enfin immergé durant 56 jours dans de l'eau. Ces souches ont pour particularité d'employer une voie métabolique particulière pour réaliser la précipitation de carbonate de calcium, la réduction des nitrates, qui présente l'avantage de conduire à la production d'ions NO_2^- qui sont des inhibiteurs de corrosion de l'acier des barres d'armature. Pour les deux souches étudiées, la méthode permet de complètement colmater des fissures d'ouverture initiale allant jusqu'à 450 μm en 28 jours de traitement, et des fissures d'ouverture initiale allant jusqu'à 500 μm après 56 jours. En l'absence de bactéries, seules les fissures d'ouverture comprise entre 200 et 300 μm sont colmatées même après 56 jours d'immersion (Figure 41). Bien que cette publication ne présente pas les impacts de l'introduction des agents de réparation sur les résistances en compression des échantillons, l'auteur a déjà démontré dans l'étude comparative citée ci-dessus [123] que l'introduction de *D. nitroreducens* avec de l'argile expansée ou des granules de charbon actif n'altère pas la résistance en compression du matériau (Figure 40). Il n'y a toutefois pas de données disponibles sur l'effet de l'introduction de *P. aeruginosa* en conjugaison avec du charbon actif ou de l'argile expansée sur les performances mécaniques du matériau. La nature de la souche bactérienne utilisée pouvant avoir un

impact important, il y a un risque que cette souche ait un effet négatif sur les performances mécaniques du matériau.

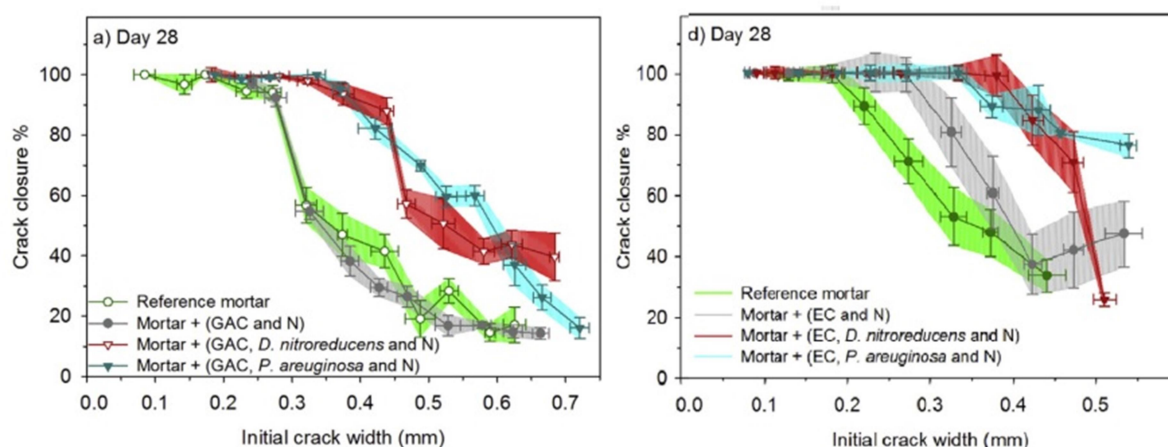


Figure 41 : Colmatage de fissures par deux souches bactériennes immobilisées sur charbon actif (GAC) ou sur des particules d'argile expansée (EC) [72].

Les méthodes les plus courantes d'immobilisation des bactéries sont l'encapsulation et l'adsorption sur des vecteurs solides, mais d'autres méthodes de mise en œuvre de l'autobiocicatrisation ont été développées : l'autoencapsulation, l'utilisation d'un système vasculaire, et l'utilisation de matériel biologique non vivant.

En provoquant l'auto-agrégation de bactéries sporulées, Da Silva *et al.* (2015) [124] ont réalisé l'autoencapsulation des spores bactériennes dans le but d'obtenir des granules mêlant spores bactériennes, nutriments et précurseurs de biominéralisation pouvant être incorporés au mélange lors de la préparation du matériau. Afin de réduire le coût de la méthode et d'améliorer sa robustesse, les auteurs emploient un consortium bactérien issu d'une station d'épuration plutôt qu'une culture axénique (c'est-à-dire ne comportant qu'une souche bactérienne pure). Les mortiers fissurés après 28 jours ont une capacité d'autocicatrisation totale des fissures de 500 μm d'ouverture initiale en 28 jours de traitement, contre 300 μm pour le témoin abiotique, sans avoir d'effets négatifs sur la résistance du matériau. Toutefois, la durée de survie des bactéries dans le matériau n'a pas encore été déterminée. Ersan *et al.* (2015) [125] emploient la même technique d'auto-agrégation des cellules pour créer des granules contenant 70 % de biomasse bactérienne, introduits au mélange à hauteur de 1 % de la masse cimentaire, auxquels s'ajoutent 5 % de nutriments (nitrate et formate de calcium).

Pour des échantillons fissurés après 28 jours, la méthode permet de totalement colmater des fissures de 450 µm d'ouverture après 28 jours de traitement, contre 200 µm pour le témoin abiotique. Pour des échantillons fissurés après 6 mois, le colmatage total des fissures est réalisé jusqu'à 350 µm d'ouverture initiale contre 150 µm pour les témoins stériles. Il y a donc une survie à long terme des bactéries, avec cependant une décroissance de leur activité. Des mesures réalisées au cours d'une étude différente [123] montre que l'intégration de ces granules dans le matériau ne diminue pas sa résistance en compression.

Wang *et al.* (2012) [126] ont testé l'application d'un système vasculaire constitué de tubes de verre inclus dans la structure de l'ouvrage et se brisant lors de la formation d'une fissure, libérant les bactéries et le milieu nutritif dans celle-ci, une méthode ayant été étudiée pour la libération d'agents de réparation synthétiques [52]. Les auteurs comparent les résultats employant des bactéries libres, contenues dans du silicagel ou dans du polyuréthane (PU), ces deux derniers réagissant lors de la formation de la fissure pour immobiliser les bactéries. La mousse de PU, comme le silicagel, ralentit la consommation de l'urée par les bactéries du fait de leur immobilisation, mais permet la production de CaCO_3 par ces dernières. La production de CaCO_3 peut atteindre jusqu'à 10 à 12 % de la masse totale de solide. Le carbonate de calcium ayant une densité généralement comprise entre 2,3 et 2,7 [127], cette masse représente pour le silicagel seulement 2% du volume total, et 0,3% pour le PU. La contribution de la biominéralisation de calcite au colmatage des fissures est donc réduite. Deux limites fortes au processus de biominéralisation de calcite sont constatées : un approvisionnement insuffisant en urée, ainsi que la réduction de l'activité bactérienne par l'accumulation de NH_3 et NH_4^+ issus de la dégradation de l'urée, molécules pourtant essentielles pour la précipitation de carbonate de calcium. Les mesures de résistance mécanique et de perméabilité à l'eau (Figure 42) permettent de comparer les effets du silicagel et de la mousse de PU, inoculées ou non avec la souche bactérienne *B. subtilis* :

- Le silicagel n'apporte pas de regain de résistance mécanique ou de perméabilité à l'eau en l'absence de bactéries. Le silicagel inoculé avec *B. subtilis* n'entraîne pas de regain significatif de la résistance mécanique du matériau, mais permet de diminuer significativement la perméabilité à l'eau de la fissure.
- La mousse de PU seule permet d'obtenir un regain de résistance en compression d'environ 60 % et de fortement réduire la perméabilité à l'eau des fissures. L'introduction de bactéries ne semble toutefois pas avoir d'impact sur la perméabilité à l'eau des fissures ou sur le regain de résistance mécanique du matériau.

Bien que cette technique de réparation permette de diminuer la perméabilité à l'eau des fissures, sa mise en œuvre n'est pas aisée. En effet, l'utilisation de tubes intégrés dans l'ouvrage est un système coûteux, difficile à mettre en place et peut nuire aux propriétés structurales de l'ouvrage. De plus, les tubes employés pour cette étude sont surdimensionnés, le potentiel de biocicatrisation est donc surestimé.

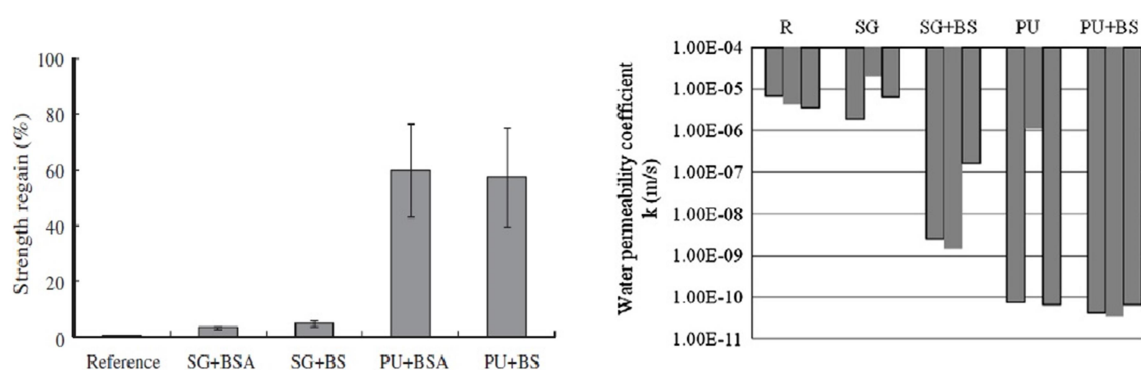


Figure 42 : Regain de résistance (à gauche) et réduction de perméabilité (à droite) de mortiers fissurés contenant des tubes d'eau (R), du silicagel (SG) ou de la mousse polyuréthane (PU), avec ou sans bactéries (BS) [126].

Matériel biologique non vivant. Afin de contourner les limites imposées par les conditions de survie et d'activité des bactéries, il est possible de n'utiliser que les éléments influençant directement la biominéralisation, c'est-à-dire les parois cellulaires et/ou les enzymes intervenant dans le métabolisme du calcium. En effet, les parois cellulaires peuvent favoriser la cicatrisation : leur charge négative favorise la précipitation de carbonate de calcium en concentrant localement les ions calcium jusqu'à saturation. L'étude menée par Pei (213) [128] a montré que l'ajout de parois cellulaires dans la préparation cimentaire permet de réduire la porosité de 1% à 3%, et d'augmenter les résistances en compression d'environ 15% sur les échantillons à 28 jours. Toutefois, le potentiel de biocicatrisation de cette méthode n'a pas été évalué au cours de cette étude.

L'utilisation d'enzymes au lieu de bactéries vivantes est une autre voie potentielle, car celles-ci peuvent catalyser les réactions à l'origine de la précipitation de carbonate de calcium avec moins de contraintes que des organismes vivants [70]. Chattopadhyay *et al.* (2008) [129] ont extrait des enzymes de type silicatéine de cultures non axéniques issues de sources chaudes, puis intégré les protéines extraites à la préparation de mortiers. Ces enzymes jouent un rôle dans la répartition des atomes de silicium et de calcium au sein du gel de C-S-H, et conduisent à une augmentation de la

résistance en compression à 28 jours pouvant atteindre 25 %. Les auteurs suggèrent que ce type de protéines peut améliorer la capacité d'autocicatrisation naturelle du matériau en agissant sur le processus d'hydratation des grains de ciment anhydres après la fissuration du mortier.

Les uréases, étant responsables du processus de biominéralisation des bactéries uréolytiques, pourraient-elles aussi être employées à la place de bactéries vivantes ? Si actuellement l'uréase est difficile à extraire et dispose d'un rendement et d'une durée de vie faibles, les progrès récents de la biologie permettront à plus long terme de multiplier l'efficacité et la durée de vie des enzymes, et de les produire en grandes quantités à coût réduit. L'utilisation d'uréase seule ou d'autres enzymes favorisant la précipitation de carbonate de calcium peut donc, à long terme, être envisageable.

1.3.4. Exobiocicatrisation des matériaux cimentaires

Si l'autobiocicatrisation est une stratégie visant à prévenir la formation de fissures dès la construction de l'ouvrage, l'exobiocicatrisation repose quant à elle sur la réparation de ces fissures par injection de l'agent de réparation biologique. Il s'agit donc d'une approche curative plutôt que préventive, avec des atouts et des limites différents. Bien qu'étant l'objet de moins d'études, l'exobiocicatrisation recèle un potentiel non négligeable, car elle s'affranchit des limites auxquelles est soumise l'autobiocicatrisation.

En effet, si la mise en œuvre de l'exobiocicatrisation implique des coûts liés au diagnostic et à la réparation des fissures, elle ne dépend pas de la nature et de l'état de l'ouvrage, ce qui est un atout sur plusieurs points. D'une part, parce qu'il est possible de réaliser les réparations sur tous les types d'ouvrages, neufs ou anciens, ce que ne permet pas l'autobiocicatrisation. D'autre part, parce que l'efficacité des réparations par l'exobiocicatrisation ne diminue pas avec l'âge de l'ouvrage ou avec son état de détérioration ; l'exobiocicatrisation devient même nécessaire pour des ouvrages ayant perdu leur capacité d'autobiocicatrisation avec le temps. Les méthodes d'exobiocicatrisation développées à ce jour s'orientent autour de deux grandes techniques : l'imprégnation d'une suspension de bactéries non immobilisées, et l'introduction de bactéries immobilisées dans un vecteur, tel que des capsules ou des gels.

1.3.4.1. Bactéries non immobilisées

L'étude menée par Ducasse-Lapeyrosse (2014) [5] repose sur la simple imprégnation des fissures par la suspension bactérienne. Des échantillons de mortiers ayant des fissures d'une ouverture moyenne de 300 μm ont été immergés dans une solution saturée de lactate de calcium contenant *Bacillus pseudofirmus* en phase exponentielle de croissance, puis placés durant un mois en chambre humide ; ce cycle a été répété trois fois au cours de l'essai. Au cours de cette étude, le colmatage des fissures a été mesuré par le biais de l'ouverture apparente, calculée à partir de la perméabilité à l'air de la fissure. Cette méthode de mesure est plus fiable que l'observation visuelle de la fissure, la couche de précipités étant en général plus importante aux lèvres de la fissure du fait des échanges importants avec l'extérieur. Le traitement permet de réduire de 75 % l'ouverture de ces fissures, en créant une couche de carbonate de calcium d'environ 80 μm d'épaisseur en moyenne [130]. Le dépôt formé est particulièrement important en surface et colmate totalement la fissure, il est néanmoins beaucoup moins développé en profondeur. En l'absence de bactéries, cette couche de cicatrisation n'est que de 16 μm en moyenne. Un aspect important de cette étude est l'utilisation du lactate de calcium au lieu d'urée en tant que source carbonée. En effet, la dégradation de l'urée conduit à la précipitation de carbonate de calcium *via* la production d'ions ammonium, mais un excès d'ions ammonium dans le matériau peut avoir des effets délétères sur le matériau puisqu'ils peuvent réagir avec la portlandite [7], [131]. Bien qu'affichant des propriétés de cicatrisation intéressantes, le protocole expérimental employé doit être adapté aux contraintes imposées par une utilisation en conditions réelles.

Sangadji *et al.* (2017) [55] ont mis en œuvre un procédé hybride entre l'autobiocicatrisation et l'exobiocicatrisation, reposant sur l'injection d'une suspension bactérienne dans un matériau spécialement conçu à cet effet. Les auteurs ont réalisé des structures reproduisant la structure poreuse des os, afin d'injecter des agents de réparation depuis l'intérieur, l'agent de réparation circulant librement dans le cœur poreux de l'ouvrage pour atteindre les fissures. Les auteurs ont par la suite adapté ce système à l'injection d'une suspension bactérienne (Figure 43).

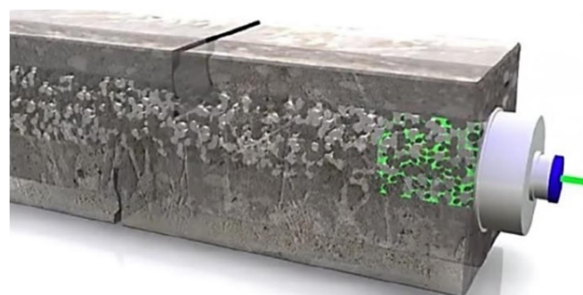


Figure 43 : Poutre de béton à cœur poreux fissurée, et suspension bactérienne en cours d'injection (figurée en vert) [90].

Après fissuration de la poutre de béton pour obtenir une ouverture initiale d'environ 250 μm , une suspension bactérienne (souche non précisée) est injectée puis l'échantillon est conservé 28 jours en chambre humide. Afin d'estimer l'impact de l'humidité sur les échantillons, certains sont conservés à 30 % d'humidité relative (cure sèche). Après 28 jours de cure humide, l'injection de la suspension bactérienne permet un colmatage total de la fissure en surface, tandis que le colmatage est limité après 28 jours de cure sèche (Figure 44). L'injection d'eau dans le cœur poreux confirme cette observation, ne révélant des fuites que pour l'échantillon ayant subi une cure sèche. La couche de colmatage formée, observée au microscope électronique, est composée d'un mélange de biomasse, de composés solubles précipités et de CaCO_3 . En certains points, la couche de calcite semble présenter des empreintes dues à la présence de bactéries, ayant la forme de trous circulaires de 1 à 2 μm de diamètre.

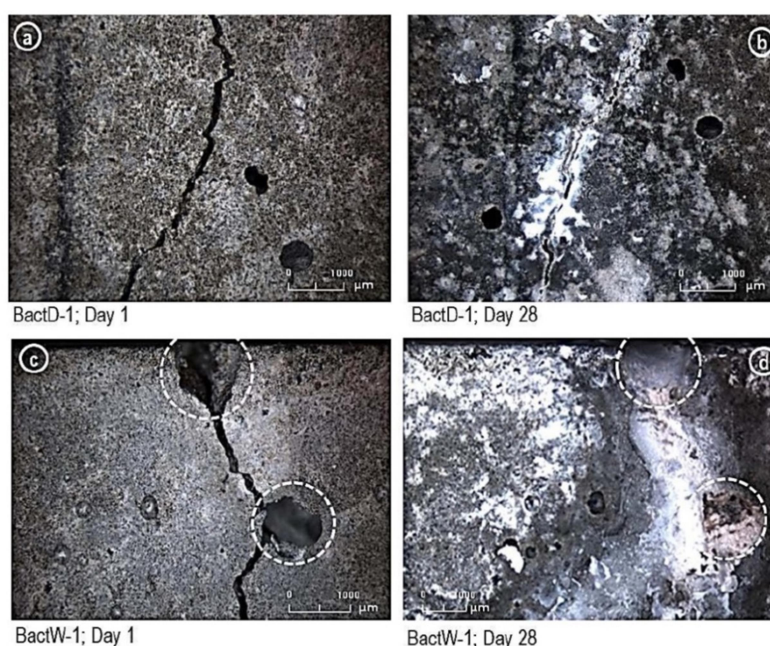


Figure 44 : Colmatage de surface de mortiers poreux (PNC) par exobiocicatrisation. Photos a et b : après 28 jours de cure sèche ; c et d : après 28 jours de cure humide [90].

Le génie génétique a aussi été exploité, à travers le projet « BacillaFilla » financé par l'université de Newcastle (2010) [132]. Les auteurs ont modifié une souche de *B. subtilis* pour augmenter sa production d'uréase et induire la formation d'une « bio-colle »

(levansucrose) renforçant la couche de colmatage. Des essais de biocicatrisation de mortiers fissurés aspergés avec un milieu nutritif contenant les bactéries sporulées montrent qu'il y a formation d'une couche de dépôt mêlant biomasse et minéraux à la surface du matériau, témoignant de l'existence du processus de biominéralisation. Des précipités en forme de roses des sables sont en effet observables, formant une couche de quelques micromètres sur le matériau (Figure 45). La morphologie en rose des sables apparente ces cristaux à de la vaterite, un carbonate de calcium souvent produit lors du processus de biominéralisation (voir section 1.2.4). Il y a cependant peu de colmatage des fissures puisque la couche de biocicatrisation est très mince et limitée à la surface des fissures. De plus, l'utilisation en extérieur d'une souche bactérienne génétiquement modifiée pose des problèmes de sécurité biologique pouvant être rédhibitoires.

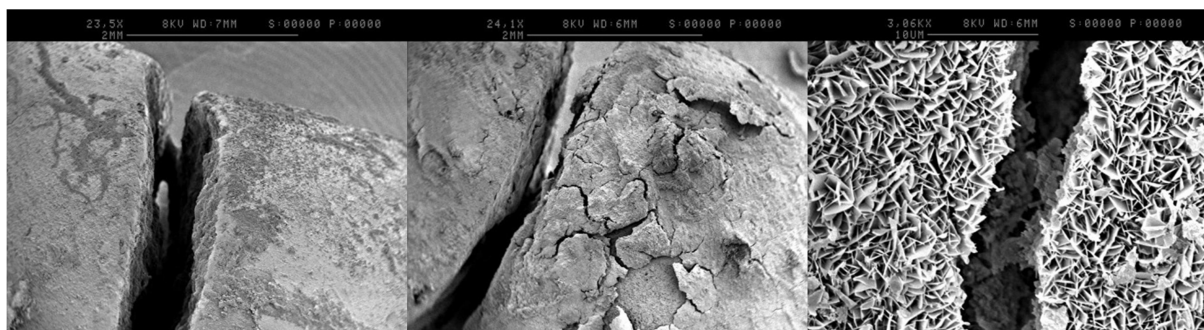


Figure 45 : Observations au MEB d'une fissure de mortier avant (à gauche) et après (au centre) biominéralisation ; à droite, observation à fort grossissement du dépôt sur une microfissure.

1.3.4.2. Immobilisation des bactéries

L'immobilisation des bactéries sur de la mousse de polyuréthane a été envisagée par Bang *et al.* (2001) [89] dans le but de les protéger des agressions de l'environnement et en particulier du pH élevé des matériaux cimentaires. Une culture de *B. pasteurii* en solution saline est mélangée au prépolymère de la mousse de polyuréthane, ce qui conduit à la polymérisation de la mousse et à l'immobilisation des bactéries en son sein. L'immobilisation sur mousse de polyuréthane, largement utilisée en biotechnologie [133], permet de fixer les bactéries et de les maintenir actives dans des milieux hostiles grâce à la biocompatibilité du matériau et à la structure ouverte de la mousse permettant la circulation de l'air et des composés chimiques à travers ses porosités. Les auteurs [89] montrent que l'immobilisation a en effet permis de favoriser la survie des bactéries tout en les rendant résistantes au lessivage, seulement une bactérie sur 10^7 étant entraînée après trempage d'un

morceau de mousse dans une solution saline (Figure 46). Pour tester le potentiel de la méthode en biocicatrisation, des blocs de béton comprenant une gouttière de 3 mm sont préparés, puis des bandes de mousse contenant les bactéries sont alors découpées puis introduites dans les gouttières. L'ensemble est alors immergé durant 28 jours dans une solution d'urée et de CaCl_2 . Le traitement provoque la formation de cristaux de CaCO_3 comprenant les empreintes des bactéries et la production d'ions ammonium au sein de la mousse. Cela ne permet toutefois pas de restaurer la résistance mécanique du matériau. Bien que cette méthode ait permis d'immobiliser des bactéries tout en maintenant leur capacité à produire du CaCO_3 , la mousse de polyuréthane est un matériau peu adapté à une utilisation sur des fissures réelles : l'introduction de lames de mousse solidifiée est impossible sur des fissures réelles.

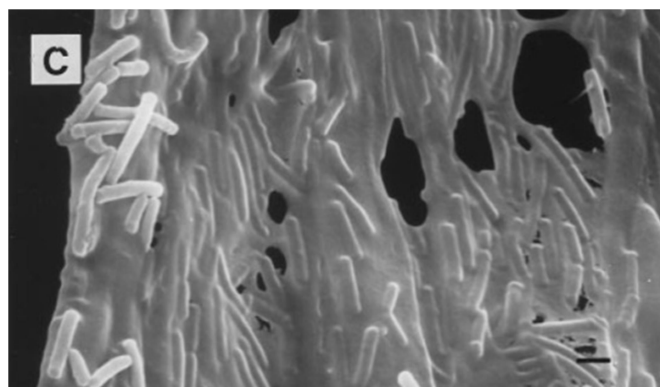


Figure 46 : Micrographie au MEB de *B. pasteurii* immobilisées dans de la mousse polyuréthane [89].

Une autre étude du même auteur [134] propose l'immobilisation des bactéries sur des billes millimétriques de verre poreux, en ajoutant les billes au milieu de culture bactérien (Figure 47). Des fissures de 3 mm d'ouverture sont pratiquées dans des prismes de mortiers, puis les billes contenant les bactéries sont introduites dans les fissures. Enfin, l'ensemble est immergé durant 28 jours dans un milieu contenant de l'urée et du CaCl_2 . Au bout de 28 jours, ce traitement a permis d'améliorer significativement le regain de résistance en compression du matériau (Figure 48) [134]. Les auteurs observent en outre des sphérulites de biocalcite à la surface des billes contenant des bactéries. L'immobilisation des bactéries sur des billes est une méthode moins agressive pour les bactéries que leur immobilisation dans de la mousse polyuréthane, et le mélange eau-billes obtenu peut être facilement manipulé et introduit dans les fissures. C'est toutefois une méthode coûteuse et limitée à des fissures de grande taille par le diamètre important des billes (supérieur à 1 mm) ; la transposition de cette méthode sur des billes micrométriques serait une voie d'étude potentiellement intéressante.

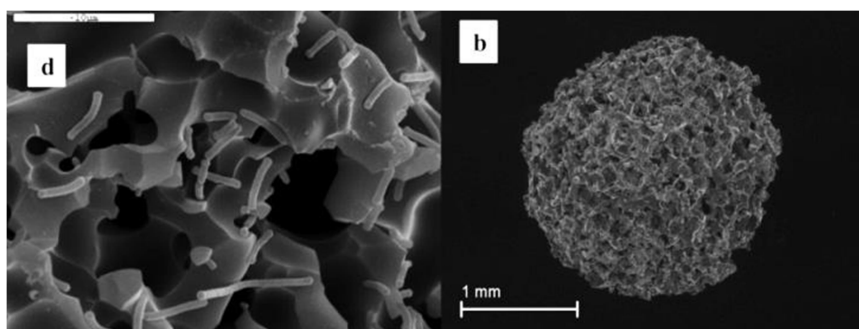


Figure 47 : Micrographie d'une bille de verre poreux contenant des bactéries [134].

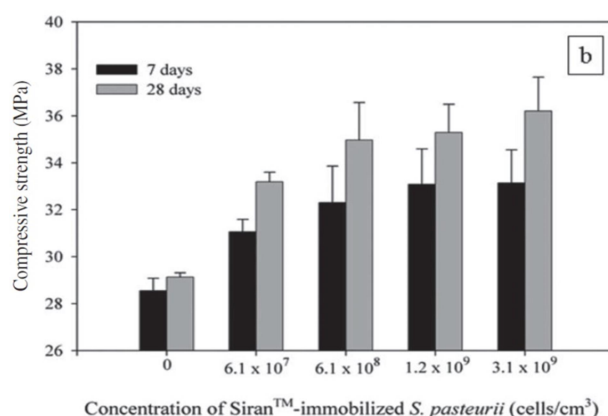


Figure 48 : Regain de résistance en compression d'échantillons biocicatrisés à l'aide de billes de verre [134].

Abo-El-Enein *et al.* (2012) [135] ont utilisé du sable comme support pour biocicatriser des fissures de 300 μm à l'aide de la souche uréolytique *S. pasteurii*. Après avoir rempli la fissure de sable, une suspension bactérienne de densité optique égale à 1, contenant 1 mol/L d'urée et de CaCl_2 , est injectée toutes les 12 heures dans la fissure durant 28 jours. Le principe de cette méthode est de créer par biominéralisation des ponts de calcite entre les grains de sable pour conférer une résistance mécanique à l'ensemble. Cette méthode s'inspire de travaux employant la biominéralisation bactérienne pour consolider les sols [84]. Le traitement a permis de retrouver 72% de la résistance en compression initiale, mais en l'absence de témoin stérile il est impossible de déterminer la contribution de la biocicatrisation par rapport au colmatage dû à l'ajout de sable et à l'autocicatrisation abiotique de la fissure. L'auteur emploie du CaCl_2 comme précurseur de biominéralisation car celui-ci, bien qu'il apporte des ions chlorure accélérant le vieillissement du matériau, permet de conférer à des colonnes de sable une résistance en compression 15 % plus élevée que l'acétate de calcium et 3 fois plus élevée que le nitrate de calcium. Ramachandran *et al.* (2001) [136] ont mené une étude utilisant une méthode similaire : un mélange de sable et d'une suspension de *S. pasteurii* à 4.10^9 bactéries/mL est introduit dans des fissures de 3 mm d'ouverture et de

profondeur variant de 12 à 25 mm, puis l'échantillon est immergé durant 28 jours dans une solution d'urée et de CaCl_2 , renouvelée à mi-traitement. Le traitement permet d'augmenter la résistance en compression de 1 à 13 MPa par rapport au témoin abiotique, ce qui équivaut à un regain compris entre 2 et 24 % de la résistance initiale.

Plusieurs études emploient des hydrogels de silice, ou silicagels, pour préserver l'activité bactérienne au sein de la fissure et immobiliser les bactéries. Cette méthode consiste à injecter l'hydrogel contenant les bactéries et les nutriments dans la fissure avant sa gélification, pour que la prise en gel se déroule dans la fissure. L'immobilisation de bactéries dans du silicagel est une technique régulièrement utilisée et permet la biocicatrisation bactérienne malgré le ralentissement d'activité provoqué par l'immobilisation des bactéries et le ralentissement de la diffusion des nutriments dans le milieu [126]. A la différence de la mousse de polyuréthane, les précurseurs de gélification ne sont pas toxiques et il est possible d'injecter l'hydrogel avant sa solidification, ce qui le rend plus polyvalent et plus simple d'emploi. Tittelboom *et al.* (2010) [137] réalisent des essais de biocicatrisation en utilisant un hydrogel contenant *B.subtilis* et du nitrate, de l'acétate ou du chlorure de calcium comme précurseur de biominéralisation. La suspension est injectée dans la fissure juste avant sa gélification, puis la fissure est immergée durant 72 heures dans une solution d'urée et du précurseur correspondant. Des témoins sans hydrogel et des témoins stériles contenant les bactéries au préalable tuées par autoclavage sont réalisés en parallèle. Bien qu'une importante baisse de perméabilité ait pu être constatée après l'injection du gel bactérien dans les fissures, l'implication des bactéries dans la baisse de perméabilité n'a pas été démontrée. En effet, le gel lui-même permet de réduire la perméabilité de la fissure, tandis que les bactéries ont un impact négligeable sur la perméabilité de la fissure (Figure 49). Suite au traitement, les échantillons ne contenant que la suspension bactérienne (BS+ CaCl_2) ont une perméabilité identique aux échantillons non traités, alors que tous les échantillons contenant de l'hydrogel (ou sol-gel) ont des perméabilités réduites. En outre, les échantillons traités avec de l'hydrogel ont des perméabilités comparables en conditions stériles ou en présence de bactéries.

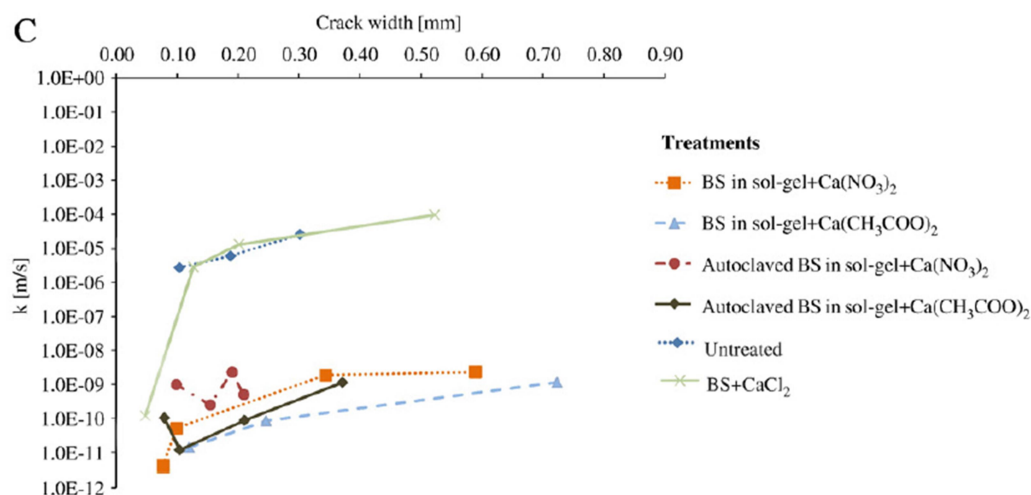


Figure 49 : Perméabilité à l'eau d' échantillons fissurés suite à différents traitements de biocicatrisation [137].

Les essais notés BS correspondent aux essais incluant des bactéries.

Une étude réalisée par Wiktor *et al.* (2015) [138] se base sur le même mode opératoire pour réaliser un essai de biocicatrisation à l'échelle pilote. Une suspension bactérienne liquide contenant du silicate de sodium (provoquant la gélification du liquide en quelques heures) a été déposée sur les fissures avant que la gélification ne se déclenche, de manière à ce que le gel se forme à l'intérieur des fissures. Cet essai a été mené dans des parkings souterrains fissurés, et l'application du gel a permis de réduire significativement la perméabilité à l'eau. En l'absence d'un témoin stérile, il est cependant impossible de déterminer dans quelle mesure l'activité bactérienne est responsable de la diminution de perméabilité des fissures, puisque l'application de silicagel dans la fissure engendre déjà une forte baisse de perméabilité à l'eau. Les auteurs constatent également que le colmatage effectué est moins important en profondeur, une perte d'efficacité pouvant être expliquée par une baisse d'activité bactérienne due au manque d'oxygène mais aussi par une mauvaise pénétration de l'agent de réparation, celui-ci étant appliqué mais non injecté dans la fissure.

A l'instar de Le Métayer-Levrel *et al.* (1999) pour la biodéposition sur les monuments historiques [92], Qian *et al.* (2016) [139] emploient un gel d'agar, afin d'immobiliser les bactéries sur la fissure. Des fissures réalisées dans des prismes de mortier sont au préalable badigeonnées avec une suspension d'agar en fusion, puis la suspension bactérienne y est pulvérisée avant la solidification du gel d'agar. Le gel contenant les bactéries est alimenté tous les jours par pulvérisation d'une solution nutritive sur la surface traitée. Dans ces travaux, les échantillons sont laissés à l'air libre, changement majeur par rapport aux autres travaux où les fissures sont maintenues à 100 % d'humidité voire en immersion durant la totalité du traitement, aucune biominéralisation n'ayant lieu en milieu sec. Cette

modification de protocole est permise par le gel d'agar qui maintient une réserve d'eau utilisable pour les bactéries durant au moins une partie des 24 heures séparant les aspersion de milieu nutritif.

A l'inverse des autres méthodes d'exobiocicatrisation, celle-ci n'est pas conçue pour permettre une cicatrisation en profondeur des fissures, mais vise une cicatrisation superficielle couplée à une biodéposition de CaCO_3 sur la surface du matériau. Après 3 jours de traitement, le coefficient d'absorption capillaire des échantillons couverts de gel bactérien est 2,5 fois inférieur à celui des échantillons stériles, tandis que les échantillons traités à l'aide d'une suspension bactérienne non immobilisée présentent des résultats intermédiaires. Ce traitement réduit en outre la sensibilité des échantillons au phénomène d'efflorescence, mais son impact sur les fissures elles-mêmes n'est pas décrit en détail. La publication évoque la possibilité d'utiliser la biominéralisation comme puits de carbone pour lutter contre le réchauffement climatique, mais cette méthode a un faible potentiel de captation du carbone par rapport aux moyens nécessaires à sa mise en œuvre (400 kg de CO_2 par 10 000 m^2 de surface traitée). Pour comparaison, la même surface de forêt nord-américaine peut piéger environ 30 tonnes de CO_2 , chaque arbre piégeant approximativement 100 kg de CO_2 [140].

1.3.5. Bilan des techniques de biocicatrisation

Il existe, au stade commercial ou au stade de recherche, une grande variété de méthodes chimiques et biologiques d'entretien des matériaux cimentaires. Ces méthodes diffèrent dans leurs coûts, leurs performances et leurs applications. Le Tableau 2 récapitule les atouts et limites des différentes techniques abordées dans cette étude. Il révèle qu'il n'y a pas de méthode idéale : le choix d'une méthode va dépendre des performances souhaitées, de la nature de l'ouvrage, des conditions climatiques, de la qualité esthétique requise ainsi que les coûts alloués d'une part à la construction et d'autre part à la maintenance de l'ouvrage.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes techniques de biocicatrisation.

Principe	Méthode	Atouts	Limites
Autobiocicatrisation : addition de bactéries au matériau lors de la fabrication.	Bactéries végétatives ou sporulées	Facilité d'emploi Faible coût Augmentation de résistance en compression Réduction de la perméabilité	Impact variable sur la qualité du matériau Autocicatrisation limitée Durée de vie inférieure à 6 mois
	Encapsulation	Durée de vie prolongée Forte autobiocicatrisation	Effet souvent négatif sur le matériau Coût de production élevé Fiabilité variable
	Membranes	Augmente les performances du matériau	Effet inconnu sur la biocicatrisation

	cellulaires / enzymes	Coût modéré Facilité d'emploi	
	Système vasculaire	Efficacité élevée Très longue durée de vie	Coût très élevé Impact négatif sur la structure Difficulté de mise en place
Bilan		Réduction des coûts d'entretien Augmentation de la durée de vie de l'ouvrage Réparation de fissures non visibles ou non accessibles	Efficacité à long terme médiocre Réserves limitées : pas de réparation en cas de réouverture de fissure Impact variable sur le matériau Augmentation des coûts de construction Inapplicable sur les ouvrages existants
Exobiocicatrisation : injection ou imprégnation de bactéries sur la fissure.	Bactéries seules	Coût limité	Efficacité limitée Bactéries vulnérables aux conditions environnementales
	Immobilisation sur gel	Meilleure survie des bactéries Le milieu contribue à la cicatrisation	Gélification potentiellement difficile à maîtriser L'immobilisation limite l'efficacité
	Immobilisation sur solides	Bonne survie des bactéries Aisé à préparer et à manipuler	Coûteux Inadapté aux fissures fines L'immobilisation limite l'efficacité
	Immobilisation sur mousse PU	La mousse réduit la perméabilité du matériau Bonne survie des bactéries	Impossible à injecter dans des fissures fines Mise en œuvre complexe
Bilan		Applicable sur tous les ouvrages Pas de limite d'utilisation Pas d'effet délétère sur le matériau	Nécessite de la main d'œuvre : surcoût. Limité aux fissures visibles et accessibles. Fiabilité encore limitée

1.3.5.1. Potentiel de biocicatrisation théorique

Un facteur limitant majeur pour les procédés d'autobiocicatrisation et d'exobiocicatrisation est la quantité d'ions calcium disponibles dans la fissure pour précipiter du carbonate de calcium. En effet, si les ions carbonate sont présents en excès grâce à la dissolution constante du CO_2 atmosphérique dans l'eau et sa transformation en ions carbonate, ce n'est pas le cas des ions calcium et un apport insuffisant peut rendre la méthode de biocicatrisation inefficace.

Dans le cas de l'autobiocicatrisation, l'apport en ions calcium est limité par la quantité d'agent de réparation que l'on peut inclure dans la pâte cimentaire, et ne dépend pas de l'ouverture de la fissure. En effet, la quantité d'agent de réparation libéré est définie par le volume de matériau impliqué dans le processus de biocicatrisation, donc par la surface interne de la fissure et l'épaisseur de matériau impliqué. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus par Ducasse-Lapeyresse (2014) [5] et de Kanellopoulos *et al.* (2016) [51] où la quantité de produits d'autocicatrisation n'augmente pas avec la taille de la fissure, ce qui se traduit par des taux de cicatrisation plus faibles pour les fissures les plus larges. Il est donc possible d'estimer grossièrement le potentiel de biocicatrisation de la méthode en fonction des paramètres utilisés.

Considérons un mortier contenant des capsules d'autocicatrisation, avec les hypothèses suivantes :

- Les capsules représentent 5 % de la masse du mélange cimentaire. Dans les travaux d'autobiocicatrisation cités précédemment, la teneur en précurseurs est généralement comprise entre 2 et 5 % puisque des concentrations plus fortes altèrent les performances mécaniques du matériau.
- Les capsules sont composées à 100 % de précurseur de biominéralisation : lactate, nitrate, chlorure, acétate, formate ou gluconate de calcium. La masse des bactéries, du support physique et des autres nutriments est considérée comme négligeable.
- Les capsules ont un diamètre de 10 μm . La création d'une fissure entraînerait l'ouverture de toutes les capsules se situant à moins de 10 μm de part et d'autre de la fissure, soit 20 μm d'épaisseur de pâte au total, donc un volume de 0,1 mm^3 par cm^2 de fissure, ou 0,2 mg pour un matériau ayant une densité égale à 2.
- Tout le calcium issu des précurseurs est converti en carbonate de calcium de densité relative comprise entre 1,8 et 2,7, valeurs minimale et maximale pour des calcaires communs [127].

Pour chaque cm^2 de surface dans la fissure, 0,2 mg de matériau cimentaire sont impliqués dans la biocicatrisation. Pour un mortier à 5 % d'agent de réparation, il y a donc une masse (m_{pr}) égale à 0,01 mg de précurseur libéré. La quantité de calcium disponible (m_{Ca}) dépend alors de la teneur en calcium du précurseur %Ca, c'est-à-dire du ratio entre la masse molaire du calcium (M_{Ca}) et celle du précurseur (M_{pr}) :

$$\%Ca = M_{Ca} / M_{pr} \quad (22)$$

$$m_{Ca} = m_{pr} * \%Ca \quad (23)$$

La teneur en calcium du carbonate de calcium permet d'en déduire la masse de carbonate $m(\text{CaCO}_3)$ pouvant être précipité, par le biais de sa masse molaire. La densité du précipité $d(\text{CaCO}_3)$ détermine par la suite son volume $V(\text{CaCO}_3)$:

$$m(\text{CaCO}_3) = m_{Ca} * M(\text{CaCO}_3) / M_{Ca} \quad (24)$$

$$V(\text{CaCO}_3) = m(\text{CaCO}_3) / d(\text{CaCO}_3) \quad (25)$$

Pour une fissure ayant une surface interne de 1 cm^2 soit 100 mm^2 , l'épaisseur de la couche de biocicatrisation peut enfin être déduite en divisant le volume de CaCO_3 produit par la surface interne. Ces calculs sont présentés dans le Tableau 3, et révèlent qu'avec ces hypothèses de travail le potentiel de biocicatrisation n'excède pas $1 \text{ }\mu\text{m}$.

Le principal facteur limitant est l'épaisseur de matériau cimentaire affecté, qui est ici de seulement $20 \text{ }\mu\text{m}$. En effet, la quantité de carbonate de calcium pouvant être précipité est proportionnelle à l'épaisseur de pâte impliquée dans le processus, donc à la taille des capsules. Ainsi, le potentiel de cicatrisation peut être porté à $100 \text{ }\mu\text{m}$ en employant des capsules de 1 mm de diamètre. Ces calculs sont applicables pour des capsules hermétiques mais pas si les précurseurs sont dispersés librement dans le matériau. L'apport de calcium est en effet dans ce cas déterminé par la profondeur de matériau affectée par la lixiviation des précurseurs vers la fissure, paramètre dépendant à la fois du matériau, du temps et des conditions auxquelles il est soumis : l'apport en calcium peut alors être largement supérieur ou inférieur à celui de précurseurs encapsulés.

Tableau 3 : Potentiel de biocicatrisation d'un béton contenant 5 % de capsules de $10 \text{ }\mu\text{m}$ selon le précurseur de biominéralisation, pour une calcite de densité de $1,8 \text{ (max)}$ ou $2,7 \text{ mg/mm}^3 \text{ (min)}$.

Source de calcium		Lactate	Gluconate	Chlorure	Nitrate	Acétate	Formate
Teneur moléculaire en calcium		18,37%	9,31%	36,11%	24,42%	25,34%	30,80%
Masse de calcium disponible (mg/cm^2)		0,037	0,019	0,072	0,049	0,051	0,062
Masse de carbonate précipité (mg/cm^2)		0,092	0,047	0,180	0,122	0,127	0,154
Volume de CaCO_3 (mm^3/cm^2)	-max	0,051	0,026	0,100	0,068	0,070	0,085
	-min	0,034	0,017	0,067	0,045	0,047	0,057
Couche de cicatrisation (μm)	-max	0,51	0,26	1,00	0,68	0,70	0,85
	-min	0,34	0,17	0,67	0,45	0,47	0,57

Dans le cas de l'exobiocicatrisation, le potentiel de biocicatrisation dépend de paramètres différents : la précipitation de carbonate de calcium ne dépend en effet plus du matériau mais du fluide injecté. La masse de carbonate de calcium pouvant être produite est alors déterminée par le volume de la fissure et par la concentration en calcium du milieu injecté : plus une fissure est large, plus la couche de biocicatrisation pouvant être générée sera importante, avec un taux de cicatrisation

fixe quelle que soit l'ouverture de la fissure. Dans le cas d'un milieu liquide saturé en précurseurs de biocicatrisation, la concentration en calcium dans la solution dépend de la solubilité du précurseur utilisé et de sa teneur moléculaire en calcium. Il peut alors en être déduit le taux de cicatrisation pouvant être atteint, correspondant au pourcentage du volume de la fissure occupé par le carbonate de calcium produit (Tableau 4). L'épaisseur de la couche de biocicatrisation pour une fissure de 250 μm est donnée pour comparaison avec l'autobiocicatrisation.

On constate une très forte disparité d'efficacité selon la molécule utilisée, notamment à cause de leurs différentes solubilités, alors qu'en autobiocicatrisation les différents précurseurs sont assez comparables. Il est toutefois possible de compenser une faible solubilité par plusieurs moyens : en dissolvant plusieurs composés en mélange pour cumuler l'apport de calcium, ou en ajoutant des particules solides de précurseurs à la solution pour augmenter l'apport en calcium au-delà du maximum permis par leur solubilité. Enfin, une fissure incomplètement cicatrisée peut être réapprovisionnée en calcium si nécessaire.

Tableau 4 : Potentiel de biocicatrisation de solutions saturées en différents précurseurs de biominéralisation, pour une calcite de densité de 2.3 (max) ou 2.7 mg/mm³ (min).

Source de calcium		Lactate	Gluconate	Chlorure	Nitrate	Acétate	Formate
Solubilité à 20°C (g/L)		79	30	745	1212	400	16,6
Teneur moléculaire en calcium		18,37%	9,31%	36,11%	24,42%	25,34%	30,80%
Masse de calcium apportée (g/L)		14,51	2,79	269,03	296,03	101,36	5,11
Masse de carbonate précipité (g/L)		36,23	6,98	671,82	739,23	253,11	12,77
Volume de carbonate (mL/L)	-max	20,13	3,88	373,23	410,69	141,61	7,09
	-min	13,41	2,58	248,82	273,79	93,74	4,73
Taux de cicatrisation	-max	2,0%	0,4%	37,3%	41,1%	14,1%	0,7%
	-min	1,3%	0,3%	24,9%	27,4%	9,4%	0,5%
Epaisseur pour une fissure de 250 μm (μm)	-max	5,03	0,97	93,31	102,67	35,15	1,77
	-min	3,35	0,65	62,21	68,45	24,44	1,18

Pour l'exobiocicatrisation comme pour l'autobiocicatrisation, le nitrate et le chlorure de calcium sont donc des précurseurs particulièrement intéressants en termes d'apport de calcium, mais cette qualité est toutefois à considérer avec prudence. En effet, le chlorure de calcium apporte des ions chlorure dans la fissure et contribue ainsi à la corrosion des barres d'armature, et un excès de nitrate de calcium peut s'avérer fatal pour les bactéries. Dans la littérature, la concentration de nitrate de calcium ou de chlorure de calcium n'excède pas quelques dizaines de grammes par litre. L'impact sur le matériau cimentaire, la compatibilité avec l'activité bactérienne et le coût des composés limitent fortement la possibilité d'introduire de grandes quantités de précurseurs dans le matériau ou dans la fissure, les potentiels de biocicatrisation calculés ici sont donc soumis à caution.

La première conclusion que l'on peut tirer de ces calculs est que le potentiel de biocicatrisation dépend non seulement de la nature du précurseur utilisé mais aussi de la méthode employée, et peut donc varier du simple au centuple. Ainsi, le potentiel d'autobiocicatrisation peut être amélioré en augmentant le volume de matériau impliqué dans le processus de biocicatrisation, tandis que le potentiel d'exobiocicatrisation peut l'être par ajout de précurseurs solides dans la solution injectée. Il est donc important pour estimer le potentiel de biocicatrisation d'une méthode de considérer tous les paramètres appliqués.

La seconde conclusion est que malgré les marges d'erreur importantes s'appliquant à ces calculs, les ordres de grandeur obtenus suggèrent que ces sources de calcium sont insuffisantes pour réaliser une biocicatrisation complète de fissures larges. Ces calculs sont pourtant contredits par les résultats prometteurs obtenus par les équipes de chercheurs travaillant sur le sujet, il y a donc d'autres facteurs intervenant dans le processus de biocicatrisation que le seul apport de calcium fourni par les précurseurs.

1.3.5.2. Potentiel de biocicatrisation pratique

Les essais d'autobiocicatrisation et d'exobiocicatrisation présentés dans cette étude bibliographique conduisent à la formation de couches de biocicatrisation d'épaisseur comprise entre 100 et 1000 μm , ce qui est largement supérieur aux valeurs calculées précédemment. Plusieurs facteurs externes et internes modifient en effet le potentiel de biocicatrisation et peuvent expliquer cette différence entre potentiels de biocicatrisation théorique et pratique.

Porosité de la couche de biocicatrisation. Le calcul d'épaisseur de la couche de carbonate de calcium réalisé précédemment est basé sur la densité de la roche calcaire. La densité des concrétions calcaires formées lors du processus de biocicatrisation n'est en revanche pas connue, et peut être largement inférieure à celle du calcaire. En effet, le carbonate de calcium se forme au sein d'un environnement contenant des bactéries et autres particules solides voire au sein d'un biofilm, ce qui réduit sa densité. La couche de biocicatrisation peut ainsi être un assemblage à forte porosité occupant un volume largement supérieur à celui d'une couche de carbonate de calcium compacte. Une telle structure ne permettrait pas un regain important de la résistance du matériau mais réduirait plus efficacement sa perméabilité, un aspect capital pour la durabilité du matériau.

Irrégularité de la couche de cicatrisation. Comme il a été observé au cours des travaux menés par Ducasse-Lapeyresse (2014) [5], la couche de biocicatrisation peut être très localisée. Dans ce cas, la biocicatrisation est importante à l'embouchure des fissures mais limitée en profondeur, hétérogénéité probablement due à un appauvrissement en O_2 à l'intérieur de la fissure nuisant à l'activité bactérienne, la souche utilisée étant aérobie. D'autres facteurs peuvent entrer en jeu comme un pH plus élevé en profondeur ou l'évaporation en surface conduisant à l'accumulation et à la précipitation de minéraux. Quelle qu'en soit la cause exacte, cette hétérogénéité de la biocicatrisation a des implications importantes sur l'efficacité du procédé, puisqu'elle permet d'obtenir un colmatage plus efficace que dans le cas d'une répartition uniforme grâce à la formation de ponts entre les deux faces de la fissure. En effet, une couche de carbonate de calcium n'occupant que 10 % du volume de la fissure peut la refermer complètement si la biocicatrisation n'a lieu que sur 10 % de sa surface en formant un bouchon superficiel. Ce colmatage superficiel est efficace du point de vue de la perméabilité de la fissure mais ne peut contribuer à un regain des propriétés mécaniques et sa localisation en surface en fait un bouchon fragile très exposé aux agressions du milieu extérieur.

Biomasse et précipités solubles. La formation de biomasse au sein de la fissure peut grandement améliorer les résultats de perméabilité en augmentant la porosité de la couche de carbonate de calcium. Les microorganismes ont en effet la faculté de produire des quantités importantes de biomasse, formant dans certains cas un épais biofilm dans la fissure ou à sa surface. Cette matière organique participe au colmatage de la fissure mais, étant biodégradable, sa durabilité est très limitée : elle ne peut donc être considérée comme un facteur de biocicatrisation. De même, les précurseurs non consommés par les bactéries précipitent dans la fissure lorsqu'elle se dessèche et les concrétions formées participent au colmatage mais sont rapidement dissoutes pour un ouvrage exposé aux intempéries. Ce biais n'est malheureusement pas connu mais peut être estimé par des

essais complémentaires éliminant la matière organique et les composés solubles au sein des fissures, visant à estimer la durabilité du colmatage vis-à-vis de diverses agressions physico-chimiques.

Diffusion d'ions calcium depuis la matrice cimentaire. Au cours du processus dit de lixiviation, la portlandite Ca(OH)_2 présente dans le matériau subit un processus de dissolution progressive, les ions calcium se retrouvant en solution migrent alors vers la surface du matériau et s'en échappent ; ils peuvent alors former par contact avec le CO_2 atmosphérique des efflorescences calcaires sur l'ouvrage, notamment dans des milieux très humides. Ce phénomène affaiblit le matériau mais peut participer à la cicatrisation des fissures comme évoqué dans la section 1.1.2. Même pour des bétons ou mortiers peu sensibles à la lixiviation et/ou ayant subi une cure de carbonatation, il y a toujours une libération d'ions calcium dans les fissures depuis la matrice cimentaire. Les quantités d'ions calcium lixiviés peuvent varier selon la nature et l'état de carbonatation du matériau, la lixiviation des ions calcium depuis la matrice cimentaire peut donc occuper un rôle important dans les procédés de biocicatrisation si le matériau n'a pas été carbonaté auparavant.

1.4. *Modification de la rhéologie*

1.4.1. Principes de rhéologie

La réparation des matériaux cimentaires fissurés repose en premier lieu sur la possibilité d'injecter l'agent de réparation dans la totalité de la fissure à réparer et de l'y maintenir une fois injecté. Il est donc nécessaire d'optimiser les propriétés rhéologiques du fluide à injecter dans la fissure pour développer une méthode d'exobiocicatrisation efficace.

La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement des matières, elle permet de définir le comportement d'un composé en réponse à une contrainte. Ses applications concernent l'agroalimentaire, la cosmétique, l'industrie minière, la pharmaceutique, le génie civil, la chimie fine (peintures notamment) et concernent une grande variété de liquides, gels ou mousses, dont les propriétés d'écoulement sont adaptées pour en faciliter l'usage, en améliorer l'efficacité voire pour simplement en améliorer l'attrait auprès du consommateur.

Les liquides sont définis par leur viscosité (η) exprimée en Pa.s, représentant leur capacité à s'écouler. La viscosité d'un liquide est déterminée en mesurant la résistance (contrainte de cisaillement) qu'elle oppose à l'agitation (taux de cisaillement) qui lui est appliquée. Pour les fluides Newtoniens, la contrainte de cisaillement τ (force appliquée au liquide pour le faire s'écouler, exprimée en Pa) est proportionnelle au taux de cisaillement (dy/dt) (vitesse de mouvement du liquide, exprimé en s^{-1}). La viscosité du fluide, le taux de cisaillement et la contrainte de cisaillement sont dans ce cas liés par la relation suivante :

$$\tau = \eta \cdot (dy/dt) \quad (26)$$

Les liquides peuvent présenter des profils rhéologiques très différents. Les plus simples sont les liquides Newtoniens, comme l'eau, dont la viscosité est constante pour une température donnée. Les liquides non-Newtoniens ont des régimes d'écoulement plus complexes, leur viscosité étant dépendante du cisaillement auquel ils sont soumis. Il existe différents types de liquides non-Newtoniens :

- Les liquides rhéofluidifiants ou pseudoplastiques, dont la viscosité diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement. Ils sont pour la plupart composés de macromolécules ou de colloïdes, qui s'assemblent en un réseau maintenu par des interactions faibles. L'agitation déstructure ce réseau et sépare les particules, réduisant sa résistance à l'écoulement;
- Les liquides rhéoépaississants ou dilatants, dont la viscosité augmente avec l'augmentation du taux de cisaillement. Plus rare, ce comportement est dû à la conversion de l'énergie cinétique en forces de Van der Waals liant les particules colloïdales entre elles, renforçant ainsi le réseau responsable de l'augmentation de viscosité parfois jusqu'à former un solide ;
- Les fluides de Bingham. Solides en l'absence de cisaillement, ils se comportent en fluides Newtoniens quand la contrainte est supérieure à un seuil d'écoulement σ_y propre au fluide étudié. Les fluides à seuil sont qualifiés de « fluides structurés », car leur état solide en l'absence de cisaillement est dû à la formation d'une structure macromoléculaire au sein du milieu. A l'état solide, ces fluides sont en général des « pseudo-gels », ayant une structure moins rigide que les gels « vrais » qui sont caractérisés par une structure non réversible et plus rigide ;
- Les fluides de Herschel-Bulkley. Ce sont aussi des fluides à seuil et dépendent de mécanismes similaires aux fluides de Bingham, mais ceux-ci adoptent un comportement rhéofluidifiant quand la contrainte est supérieure au seuil d'écoulement.

La Figure 50 représente qualitativement la contrainte en fonction du taux de cisaillement pour ces liquides. Ces rhéogrammes peuvent varier de manière très importante en fonction de la nature de l'épaississant utilisé, de sa concentration et des conditions auxquelles le milieu est soumis. Le comportement d'un fluide donné est souvent représenté par ce type de rhéogramme, pouvant avoir en ordonnées la contrainte de cisaillement ou la viscosité du fluide, en fonction du taux de cisaillement imposé au fluide.

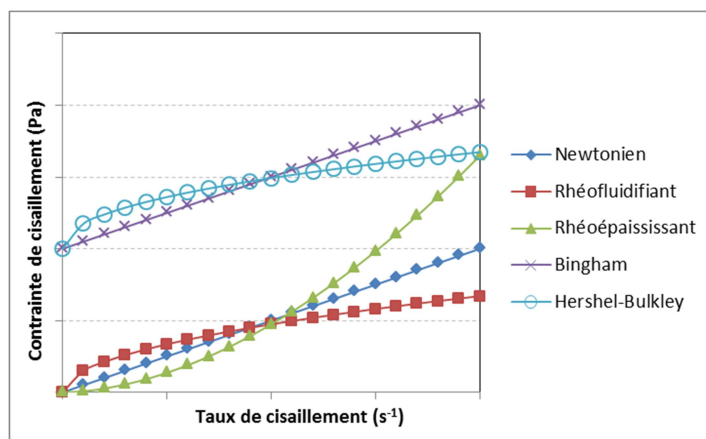


Figure 50 : Comportement des différents types de fluides.

Certains de ces fluides, majoritairement des suspensions colloïdales, voient leur viscosité évoluer en fonction du temps durant lequel le cisaillement leur est appliqué (Figure 51). Lorsqu'on les soumet à un cisaillement, deux comportements peuvent être observés :

- Un comportement thixotrope : la viscosité diminue progressivement lors de l'agitation et remonte progressivement au repos ;
- Un comportement rhéopexe : la viscosité augmente progressivement lors de l'agitation, et diminue progressivement au repos.

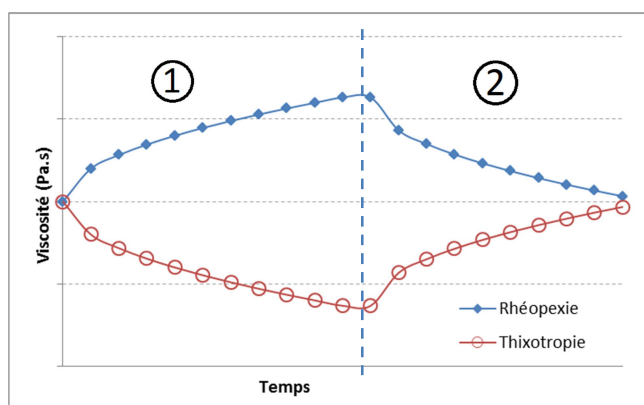


Figure 51 : Comportements rhéopexe et thixotrope de fluides lors d'un cisaillement constant (1) suivi d'une période de repos (2).

Les gels sont formés par un réseau tridimensionnel emprisonnant l'eau et limitant les mouvements dans l'ensemble de la structure. Ils sont réalisés à l'aide de macromolécules ou de colloïdes, faisant intervenir différents mécanismes et donnant donc des propriétés différentes : les gels vrais, et les pseudo-gels [141].

Les gels vrais sont le résultat d'une réaction de réticulation entre les macromolécules, qui sont alors reliées par des liaisons covalentes. Ces liaisons sont rompues de manière irréversible si une contrainte trop élevée leur est appliquée, ce qui déstructure le gel. Ces gels sont les plus résistants, mais ne peuvent retrouver leurs propriétés s'ils sont déstructurés.

Les pseudo-gels, appelés aussi gels « faibles » ou gels physiques, sont des fluides de Herschel-Bulkley. Ils se caractérisent par un réseau moins solide : les molécules, simplement enchevêtrées, sont liées entre elles par des interactions de type électrostatique. Sous une contrainte suffisante, ce gel devient un liquide dont la viscosité diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement. Toutefois, ces interactions se refont en permanence : si le cisaillement diminue, la viscosité augmente et le gel se reforme (Figure 52).

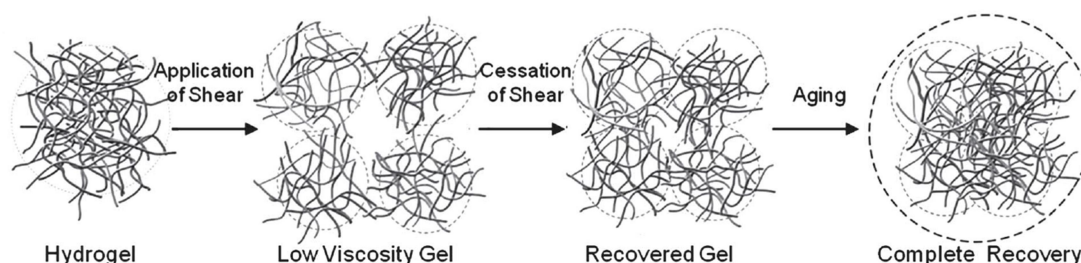


Figure 52 : Effet rhéofluidifiant des suspensions de macromolécules [142].

1.4.2. Principaux types d'agents rhéologiques

Il existe une très grande variété de composés susceptibles de modifier les propriétés rhéologiques d'un milieu. Ces composés, seuls ou en mélange, permettent d'obtenir des propriétés rhéologiques spécifiques, dépendantes ou non des propriétés physico-chimiques de leur environnement. Ils peuvent être classés en quatre groupes en fonction de leur nature :

- Les silicates colloïdaux ;
- Les polysides ;
- Les polypeptides et protéines ;
- Les polymères de synthèse.

Les colloïdes sont des particules organiques (macromolécules) ou minérales (silicates) de taille micro- ou nanométrique, que la gravité ne suffit pas à les faire décanter. Parmi les silicates colloïdaux, on distingue deux catégories :

- Les nanoparticules de silice. Les suspensions de particules de silice nécessitent l'ajout d'un surfactant pour être stabilisées. Les particules peuvent également être recouvertes d'un revêtement partiellement hydrophobe jouant le même rôle que le surfactant. Les suspensions de silice peuvent former des gels (silicagels), et sont souvent utilisés pour l'immobilisation bactérienne.
- Les phyllosilicates, ou argiles. Les argiles sont des plaquettes micrométriques chargées différemment sur la tranche et sur les faces, les rendant pour la plupart très sensibles aux modifications de pH ou à la présence d'ions en solution. Certaines argiles ne se présentent pas sous forme de plaquettes mais d'aiguilles, on parle alors d'argiles fibreuses.

En suspension, les particules de silicates colloïdaux interagissent entre elles par des interactions électrostatiques. L'attraction entre les particules limite leur mouvement relatif et elles altèrent ainsi la mobilité du liquide pour agir comme des épaississants. Les liaisons formées entre les particules peuvent être brisées par de faibles cisaillements et se refont progressivement au repos, conférant à la plupart de ces suspensions un caractère thixotropique et rhéofluidifiant. A forte concentration, ces particules peuvent former un réseau suffisamment dense pour provoquer la gélification du milieu au repos.

Ces gels physiques peuvent facilement être déstructurés en fluides rhéofluidifiants et se restructurent après un repos prolongé. Grâce à ces propriétés, les silicates colloïdaux sont utilisés régulièrement en industrie (peintures, extraction minière), mais aussi en médecine et en agro-alimentaire [143]. Les argiles les plus employées pour leurs propriétés gélifiantes sont l'attapulгите, la smectite, la bentonite, la sépiolite et l'hectorite. Ces argiles sont rarement employées seules : elles sont souvent combinées avec des épaississants organiques, tels que des gommes ou des celluloses modifiées qui stabilisent les suspensions d'argiles et évitent qu'elles ne décantent lors d'un stockage prolongé [144].

Les polysaccharides, également nommés polyosides, sont des polymères d'origine biologique composés d'unités osidiques (sucres), dont la diversité est très importante. Parmi ces molécules, on retrouve l'amidon et la cellulose (pouvant être modifiée pour créer des dérivés), les gommes d'origine végétale (guar, caroube, arabique, gellane, pectine...), microbienne (xanthane, Welan), algale (carraghénanes, alginates, Agar), voire animale (chitosane). En suspension, ces macromolécules se comportent comme des hydrocolloïdes et agissent comme épaississants : les longues chaînes de polymère s'enchevêtrent et augmentent la viscosité de la suspension. Certaines molécules peuvent former un gel physique si leur concentration est suffisante. Elles produisent généralement des suspensions rhéofluidifiantes, car l'enchevêtrement de molécules à l'origine de la viscosité se reforme au repos. A de faibles cisaillements, les interactions entre macromolécules se refont plus vite qu'elles ne sont brisées et la suspension a un comportement Newtonien. La viscosité du fluide commence à baisser lorsque le taux de cisaillement devient suffisamment important pour détruire les interactions plus vite qu'elles ne se reforment [141].

Les suspensions épaissies à l'aide de polyosides sont en général stables et homogènes, mais sensibles aux contaminations biologiques ; elles peuvent alors perdre leurs propriétés, les molécules étant dégradées par les microorganismes les utilisant comme nutriments. Il existe une grande variété de ces composés, d'autant que leurs propriétés peuvent être modifiées : la longueur de la chaîne de polymères, sa ramification et sa nature peuvent être choisies pour obtenir des caractéristiques physico-chimiques spécifiques. Parmi ces propriétés, les plus importantes sont le pouvoir épaississant, le caractère Non-newtonien et la sensibilité aux conditions du milieu (ions spécifiques, pH, température).

Certains polysaccharides peuvent se comporter comme des gélifiants. Ils peuvent en effet se réticuler suite à une modification du milieu (pH, température, contre-ion multivalent) et créer un réseau de liaisons fortes qui donne lieu à la formation d'un gel vrai. C'est le cas des pectines, de l'Agar et de l'alginate de sodium (Figure 53). La déstructuration d'un gel vrai se traduit à l'échelle moléculaire par la découpe progressive du réseau en des amas de colloïdes de plus en plus petits, jusqu'à former une suspension dont la viscosité est assurée par les interactions faibles entre colloïdes, de la même manière que pour un épaississant. Cette propriété est employée par Le Métayer-Levrel (1999) [92] qui a préparé un gel d'Agar puis l'a broyé afin d'obtenir une pâte pouvant être badigeonnée sur des échantillons. De rares polysaccharides permettent de former des gels physiques à forte concentration. Ne nécessitant pas une phase de gélification comme les gels vrais, ces molécules (e. g. xanthane, schizophyllane, scléroglycane) sont des épaississants dont les chaînes de polymères sont très rigides,

le réseau colloïdal formé au repos est donc particulièrement robuste et peut conduire à la formation d'un gel physique si la concentration est suffisante [141].

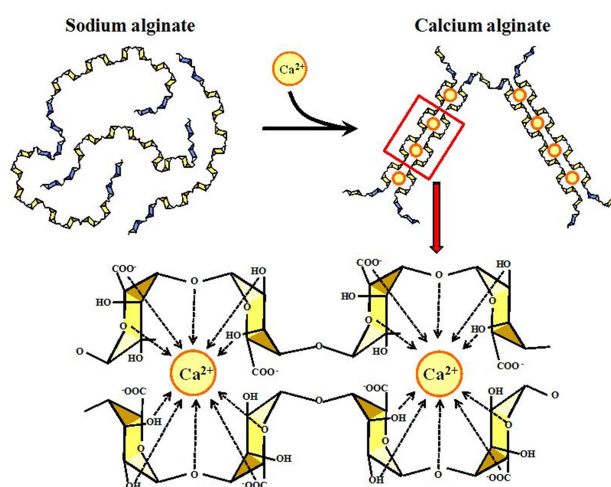


Figure 53 : réaction de gélification de l'alginate de sodium [145].

En tant que macromolécules, les polypeptides et protéines ont un comportement d'hydrocolloïdes tout comme les polysides. Toutefois, du fait du grand nombre de groupements fonctionnels sur la chaîne, ils ont une forte tendance à la gélification. La gélification peut être provoquée par des interactions électrostatiques entre les chaînes, par la réticulation par des contre-ions, ou par réaction entre les groupements eux-mêmes [142]. Les plus courants sont l'albumine, la gélatine et la caséine, très utilisés en agroalimentaire, soumis à des réactions de réticulation lors de changements de température ou de pH. Dans le cadre particulier de la médecine, il existe des polypeptides et protéines spécialement conçus pour être injectables, fluides lors de l'injection mais solides au repos [146]. Certains types de protéines, comme l'albumine, possèdent aussi un effet moussant de par leur caractère amphiphile, à la fois hydrophobe et hydrophile.

Il existe plusieurs polymères de synthèse permettant de modifier la viscosité des fluides, donnant généralement des gels : poly(vinyl alcool), polyacrylamide, polyéthylène glycol, poly(carbamoyl sulfonates), poly(acides acryliques) [147], [148]. Ces molécules sont toutefois moins connues car peu utilisables en agroalimentaire, et surtout destinés à des applications spécifiques ou à la cosmétique. Leur principal mode d'action est la réticulation, pour former des gels solides et stables aussi bien chimiquement que biologiquement, mais certains peuvent aussi être utilisés comme épaississants colloïdaux.

1.4.3. Synergies entre composés

La littérature fait état de synergies entre différents composés, permettant d'obtenir des propriétés supérieures en mélange plutôt qu'avec des composés seuls. Généralement, on observe une amplification des effets des deux composés. Ces synergies peuvent être particulièrement intéressantes, et ont été observés dans une variété de cas présentés ci-après.

Entre un polyoside et une argile. Les synergies entre polysaccharides et argiles sont bien connues et ces deux composés sont utilisés en mélange depuis plusieurs décennies pour conférer des propriétés supérieures aux suspensions utilisées dans le domaine de l'agriculture ou des produits cosmétiques [149], [150]. Les composés les plus employés sont le xanthane, le carboxyméthylcellulose (CMC), le carbomer ou certains polymères acryliques modifiés (HASE). Ceux-ci peuvent être combinés avec différentes argiles, en particulier du type magnésium-aluminium-silicate (MAS), en fonction du degré de synergie entre le composé organique et l'argile. L'association de ces composés permet d'obtenir un gain de viscosité et la stabilisation de la suspension par le ralentissement de la décantation de l'argile [150]. Une étude de Faers *et al.* (2006) [144] montre que le mélange gomme-argile peut être optimisé de manière à éviter la sédimentation d'une suspension au repos tout en maintenant une viscosité faible. En augmentant le caractère rhéofluidifiant de la suspension et lui conférant la possibilité de former un gel faible, les auteurs formulent des fluides de Herschel-Bulkley en employant de l'attapulгите ou de la montmorillonite. Plusieurs études font état du même type de synergie, entre CMC et bentonite [151], entre kaolin et chitosane [152] ou entre guar et kaolin [153].

Entre surfactant et argile, pour la formation de mousses. Les particules d'argile tapissent la paroi des bulles, formant ainsi une barrière à l'évaporation, mais limitent aussi les phénomènes de drainage et de coalescence. Cet effet n'est toutefois pas limité aux argiles : une grande variété de colloïdes stabilisent efficacement les mousses par des mécanismes similaires [154]–[158].

Entre polyosides et bactéries [67]. Le xanthane et autres polysaccharides peuvent jouer un rôle dans la nature des cristaux formés à l'issue du processus de biominéralisation. En effet, les polysaccharides font partie des EPS composant les biofilms, et la présence de xanthane (polysaccharide extracellulaire composant le biofilm produit par *Xanthomonas campestris*, extrait et utilisé comme épaississant en agroalimentaire) dans le milieu de culture présente plusieurs effets similaires à la présence d'un biofilm : celui-ci stabilise la vaterite formée et retarde sa transformation en calcite, il fournit des sites de nucléation pour le carbonate de calcium et évite qu'elle ne se forme sur les bactéries, évitant qu'elles ne se tuent en s'emmurant ; enfin, le xanthane peut capter les ions

calcium puis les libérer lors de sa dégradation, favorisant la formation de carbonate de calcium par concentration des ions calcium.

Entre argiles et bactéries. L'ajout d'additifs peut avoir des effets importants sur la croissance des bactéries, car ces composés modifient la mobilité de l'eau et des composés s'y trouvant, et peuvent s'adsorber aux bactéries. Les composés chimiques qu'ils peuvent libérer, leur impact sur le pH et leur éventuelle charge électrostatique sont autant de caractéristiques qui peuvent modifier l'activité bactérienne. Les argiles en particulier occupent un rôle important vis-à-vis des bactéries: elles peuvent avoir un impact sur la formation du biofilm, sur la croissance bactérienne et sur le processus de biominéralisation. En effet, plusieurs études ont montré que les argiles ont un lien étroit avec les bactéries du sol (Figure 54) : les EPS formés autour des bactéries constituent un liant emprisonnant les plaquettes d'argile avec les bactéries au sein du biofilm, formant des micro-agrégats [159]–[161]. L'opposition des charges entre les bactéries (chargées négativement) et les particules d'argile (chargées positivement) contribue à ce phénomène en favorisant l'adhésion des particules d'argile à la paroi cellulaire. La capacité d'absorption des bactéries par des argiles est connue depuis plusieurs décennies. En effet, Barr (1957) [162] a observé que l'addition de 10 mg d'attapulгите activée dans 5 mL de culture de *Staphylococcus aureus* permet de réduire la population cellulaire de $1,55.10^9$ à $7,40.10^8$ bactéries/mL par simple adsorption, soit une réduction de la population de 52 %. Ce pourcentage s'élève à 95 % quand 100 mg d'argile sont ajoutés. Ces résultats sont particulièrement probants pour l'attapulгите, comparée à de l'Halloysite (adsorption de 2 % de la population bactérienne) et du Kaolin (adsorption de 19 % de la population bactérienne). Ces argiles n'ont en revanche aucun pouvoir adsorbant sur les trois autres souches étudiées (*Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis* et *Shigella paradysenteriae*), ce qui suggère que le choix de la souche bactérienne a un rôle capital dans l'interaction argile-bactérie. *S. aureus* étant la seule bactérie Gram-positif étudiée au cours de ces essais, il est possible que la composition de la paroi cellulaire soit en cause.

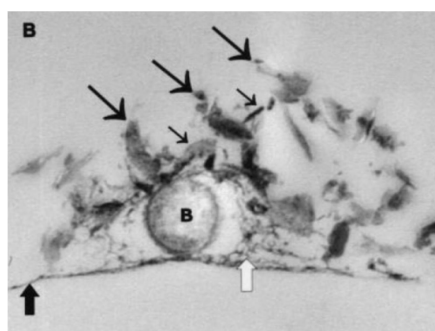


Figure 54 : Micro-agrégat comprenant des plaquettes d'argile (flèches noires), des EPS (flèche blanche épaisse), et une bactérie Gram-négative (B) fixée au substrat (flèche noire épaisse) [159].

Les plaquettes d'argiles, adhérant aux bactéries par des interactions électrostatiques entre les bords des plaquettes d'argile et la membrane cellulaire, entourent la bactérie dans une enveloppe protectrice. Cette synergie entre argiles et bactéries aurait de nombreux effets positifs sur l'activité bactérienne, puisqu'elle contribuerait à créer un microenvironnement protecteur [163]–[166]. :

- Limitation des effets de stress comme la déshydratation, l'ingression de composés toxiques, les variations de composition du milieu et les rayons UV ;
- Limitation des variations de pH par l'effet tampon des argiles ;
- Protection contre la prédation par les protozoaires et les virus.

England *et al.* (1993) [163] citent ainsi plusieurs cas où des bactéries du genre *Rhizobium* se développent mieux dans des sols amendés en bentonite ou en kaolinite. Toutefois, cet effet bénéfique n'est observable que dans des sols non stériles. Le bénéfice de l'argile pourrait donc être essentiellement lié à la compétition et à la prédation entre les différents microorganismes du sol, notamment la prédation des bactéries par les protozoaires.

Une étude réalisée par Alimova *et al.* (2009) [161] montre que suite à l'inoculation par une culture de *Pseudomonas syringae* d'un milieu contenant de l'argile (hectorite), il y a une formation rapide d'agrégats de taille comprise entre 20 µm et 1 mm dans la culture. Ces agrégats sont composés d'amas de plaquettes d'argiles au sein desquels le biofilm se développe. Cette production de matière au sein de la matrice argileuse provoque une expansion du milieu épaissi et une modification de ses propriétés, s'amplifiant jusqu'à ce que le biofilm cesse de croître ou soit détruit (Figure 55). Ces résultats confirment les interprétations faites par Vieira *et al.* (1995) [166], avançant que l'argile renforce le biofilm, agit comme un réservoir de nutriments et stimule la production de biofilm par les bactéries. Les interactions argiles-bactéries sont donc réciproques, l'activité bactérienne pouvant modifier la structure, la composition et les propriétés des argiles avec lesquelles elles sont cultivées, tandis que les argiles elles-mêmes modifient l'activité bactérienne.

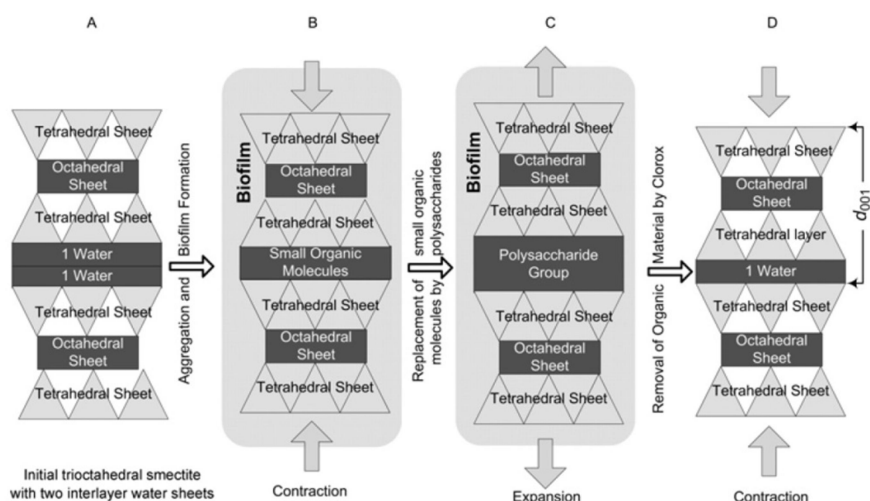


Figure 55 : Modification de la structure de la smectite par le développement du biofilm bactérien [161].

L'addition d'argile à des cultures bactériennes est actuellement étudiée pour créer des systèmes de bioréacteurs argile-bactérie [167]–[169], ou encore pour l'immobilisation des bactéries [170]. Les études citées montrent que les synergies entre argiles et bactéries ne sont pas des cas isolés mais concernent une large variété d'argiles (Sépiolite, Attapulgite, Bentonite, Laponite, Hectorite, Illite) et de microorganismes (*Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, boues activées de station d'épuration). L'ajout d'argiles peut toutefois avoir un effet négatif sur la croissance microbienne en limitant la diffusion des gaz et des nutriments dans le milieu, les rendant moins accessibles pour les bactéries [161].

CHAPITRE 2.

Introduction générale

2.1. *Objectifs de la thèse*

De nombreux travaux ont étudié les possibilités de biocicatrisation des matériaux cimentaires et ont permis de dégager une grande variété de procédés possibles. Toutefois, si des résultats prometteurs ont été obtenus en laboratoire, aucune méthode n'est actuellement adaptée à une utilisation en conditions réelles. Le développement d'une méthode de biocicatrisation est un processus difficile, car il repose sur une technologie du vivant. En effet, la mise au point d'un bioprocédé nécessite son optimisation sur deux aspects :

- *Volet technologie* : technique utilisée pour effectuer la biocicatrisation, risques liés à sa mise en œuvre, coûts d'utilisation, fiabilité, performances à court et à long terme ;
- *Volet biologie* : survie des microorganismes à court et à long terme, contaminations, activité métabolique.

Nous développerons au cours de ce projet une méthode d'exobiocicatrisation des matériaux cimentaires s'appuyant sur les travaux réalisés par Jean Ducasse-Lapeyrosse (2014) [5]. Au cours de ses travaux de thèse, Ducasse-Lapeyrosse a mis au point une méthode de culture adaptée à la croissance bactérienne et à la production de quantités significatives de carbonate de calcium par la bactérie *Bacillus pseudofirmus*. Cette méthode permet de colmater de manière significative des fissures de 200 μm d'ouverture initiale par immersion de celles-ci dans une suspension bactérienne. L'objectif de ce travail de thèse est de mettre au point une méthode de réparation écologique alternative aux résines époxy actuellement utilisées pour colmater les fissures de moins de 500 μm au sein d'ouvrages en matériaux cimentaires. Pour ce faire, la méthode développée par Ducasse-Lapeyrosse doit donc être modifiée par rapport aux volets technologique et biologique cités précédemment, tout en restant respectueuse de l'environnement. La méthode d'exobiocicatrisation développée au cours de ce projet doit donc être expérimentée en laboratoire (en conditions contrôlées) mais aussi en conditions réelles, à travers des essais *in situ* permettant d'évaluer la sensibilité de la technique face aux contraintes environnementales d'une utilisation en extérieur et face aux contraintes technologiques d'une utilisation à l'échelle commerciale (Figure 56).

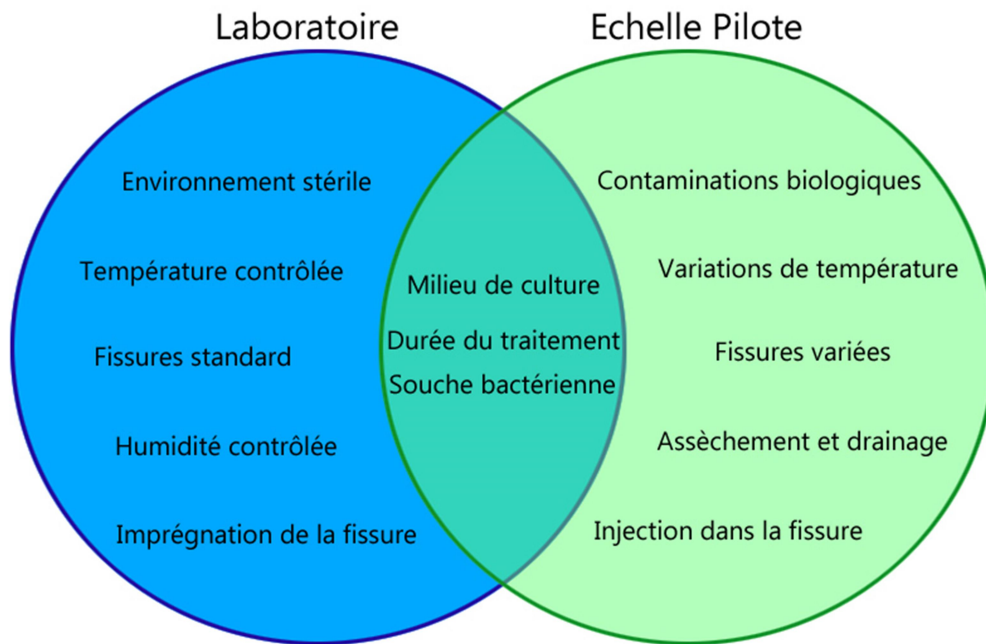


Figure 56 : Conditions d'application de l'exobiocicatrisation selon l'échelle considérée (en laboratoire/in situ).

2.2. Démarche scientifique de la thèse

Pour réaliser les objectifs fixés pour ce projet de recherche, nous avons fractionné celui-ci en deux grandes étapes. Ces étapes correspondent respectivement à l'aspect technologique et à l'aspect biologique de la mise au point d'une méthode d'exobiocicatrisation :

- *Volet technologie* : création d'un système d'injection du milieu bactérien dans la fissure. Il s'agit de développer un moyen rapide et peu coûteux de remplissage d'une fissure indépendamment de sa géométrie ;
- *Volet biologie* : Formulation d'un milieu dont la rhéologie est modifiée pour permettre une injection optimale dans les fissures de 150 à 500 μm et une production optimale de CaCO_3 par la souche bactérienne étudiée.

2.2.1. Mise en œuvre de la technique d'exobiocicatrisation

Dans la plupart des études présentées au cours de l'étude bibliographique, la biocicatrisation est réalisée par immersion de l'échantillon dans le milieu bactérien. Plus rarement, la suspension bactérienne est injectée directement dans la fissure à l'aide d'une seringue, jusqu'à saturation. Il est évidemment impossible d'immerger l'ouvrage à réparer, et une injection simple ne permet pas d'assurer un remplissage complet de la fissure. Or, la voie d'administration du milieu est très importante pour le processus de biocicatrisation :

- Elle définit le taux de remplissage de la fissure ;
- Elle définit les contraintes d'utilisation : temps d'injection, pression, volume, matériel.

La première étape de ce travail de thèse consiste d'une part à créer un dispositif d'injection adapté aux fissures étudiées et d'autre part à mettre au point des techniques d'évaluation de l'efficacité du dispositif en question. Cette étape, par le biais des expérimentations nécessaires à son accomplissement, contribue indirectement à déterminer les propriétés rhéologiques attendues pour le milieu de biocicatrisation.

Une fois le dispositif d'injection conçu, il convient de mettre au point la formulation permettant la réalisation de l'exobiocicatrisation. Il existe une grande variété de molécules pouvant modifier la rhéologie de solutions aqueuses (voir section 1.4.2), mais seulement quelques-unes conviennent à nos objectifs. La sélection d'additifs utilisés pour modifier le milieu de biocicatrisation est donc réalisée par rapport aux critères suivants :

- Prix et disponibilité ;
- Propriétés rhéologiques (obtention d'un fluide rhéofluidifiant) ;
- Interactions avec le milieu de culture (pH compris entre 6 et 9, riche en ions calcium, température inférieure à 40°C) ;
- Interaction avec les bactéries (biocompatibilité, antagonismes ou synergies) ;
- Facilité de préparation et répétabilité ;
- Respect de l'environnement (absence de toxicité et molécules biosourcées).

Une étude bibliographique a donc été réalisée pour déterminer les additifs pouvant être employés pour modifier le milieu de biocicatrisation ; leurs propriétés rhéologiques dans le milieu de culture ont par la suite été caractérisées de manière à sélectionner la formulation la plus efficace pour injecter les bactéries dans les fissures étudiées.

2.2.2. Etude de la croissance bactérienne dans le milieu d'injection

Des essais de croissance réalisés en milieu épaissi (modifié par ajout d'épaississants) et en milieu non épaissi (ne contenant pas d'épaississants) sont conduits, afin de pouvoir caractériser, dans chaque condition :

- La cinétique de croissance bactérienne ;
- Le phénotype accompagnant la croissance (morphologie, évolution du pH) ;
- La production de carbonate de calcium biogénéré.

Ces essais visent en premier lieu à obtenir une caractérisation la plus complète possible de la souche bactérienne étudiée (*Bacillus pseudofirmus*) et de son adaptation aux techniques de culture employées, afin d'obtenir une production optimale de carbonate de calcium et garantir la répétabilité des essais.

Le second principal objectif de ces essais est de produire une référence de la production de carbonate de calcium en milieu épaissi, dans des conditions proches de celles appliquées lors des essais de biocicatrisation. Les résultats ainsi obtenus permettent d'estimer la quantité maximale de carbonate de calcium pouvant être produite.

2.2.3. Etude du potentiel de biocicatrisation de mortiers fissurés

Les étapes précédentes ont permis de concevoir un système d'injection et de formuler une suspension permettant une injection optimale dans des fissures de 150 à 500 µm et une précipitation maximale de CaCO_3 par *B. pseudofirmus*. Cette méthodologie a été appliquée par la suite sur des matériaux cimentaires fissurés, au cours d'essais de biocicatrisation. Les essais de biocicatrisation ont été réalisés en trois étapes successives, allant de la technique la plus fondamentale à la plus appliquée.

Dans un premier temps, des essais de biocicatrisation en laboratoire en conditions contrôlées ont été menés, par injection périodique de la suspension bactérienne épaissie dans des éprouvettes de mortier stériles, fissurées et carbonatées. Ces échantillons ont été maintenus à une température et un taux d'humidité propices à l'activité bactérienne, et donc à la production d'une quantité maximale

de carbonate de calcium. Ces résultats permettent de déterminer le potentiel de biocicatrisation de la méthode et d'étudier la nature de la couche de biocicatrisation créée.

Dans un second temps, des essais similaires ont été conduits *in situ* à Douai, sur le même type d'échantillons. Par comparaison de ces résultats avec ceux obtenus lors des essais de biocicatrisation, cet essai permet d'évaluer la faisabilité du procédé quand il est soumis à des conditions d'utilisation proches d'un usage réel. La dernière étape consiste à tester la méthode sur une installation à l'échelle pilote. Dans la perspective d'une utilisation commerciale (contraintes économiques, environnementales et pratiques), elle consiste à réaliser l'injection de suspension bactérienne épaissie dans une dalle de béton fissurée de grande taille, en intérieur. Cet essai est principalement axé sur le volet « technologie » de la méthode et le volet « biologie » y revêt une importance moindre, celui-ci ayant été traité de manière plus exhaustive lors des essais précédents. L'adaptation des techniques employées pour réaliser la biocicatrisation à cette échelle, en particulier le système d'injection, est la clef de voûte de cet essai.

La Figure 57 (page suivante) présente les différentes étapes de la démarche scientifique de ce travail de thèse, organisées par ordre chronologique.



Figure 57 : Etapes scientifiques de la thèse.

CHAPITRE 3.

Sélection d'épaississants pour la formulation de la suspension d'injection épaissie

3.1. *Introduction*

Les additifs rhéologiques sélectionnés sont des épaississants de deux natures différentes : des gommes et des argiles. Ces épaississants sont rhéofluidifiants, biocompatibles, non polluants et certains d'entre eux présentent un caractère thixotrope, ce qui correspond aux propriétés souhaitées pour la mise au point d'un milieu d'injection. Malgré les études disponibles dans la littérature permettant de prévoir le comportement de ces épaississants, les conditions de préparation et d'utilisation appliquées dans le cadre de ce projet (en particulier, la richesse en calcium du milieu utilisé et son pH) diffèrent des cas décrits dans la littérature, et peuvent fortement influencer les résultats.

Il n'est donc pas possible d'utiliser directement les résultats de la littérature, ce qui rend nécessaire la caractérisation expérimentale des épaississants envisagés pour ce projet. La littérature est exploitée pour connaître les propriétés des épaississants étudiés et ainsi prévoir leur comportement dans les milieux utilisés pour ce projet, mais aussi pour créer de nouvelles formulations. C'est par exemple le cas du Welan dont la composition est proche du xanthane et peut donc lui aussi présenter des synergies avec des argiles, bien que les mélanges Welan-argile soient encore peu documentés [171] .

La mise au point d'une formulation adaptée à l'injection est réalisée en deux phases successives. La première phase permet d'éliminer les composés ne pouvant pas être utilisés dans le milieu épaissi, d'abord empiriquement puis par le biais d'une caractérisation rhéologique permettant de les discriminer par rapport à leur caractère rhéofluidifiant et/ou thixotrope. La deuxième phase consiste à exploiter les synergies connues entre composés pour concevoir des mélanges d'épaississants plus performants que les suspensions pures : ceux-ci sont préparés et caractérisés pour aboutir au choix d'une formulation dont les propriétés rhéologiques facilitent l'injection dans des fissures de 150 à 500 μm d'ouverture en évitant le drainage post-injection.

Les conditions anaérobies en profondeur dans la fissure peuvent être un facteur limitant du procédé à travers la limitation de l'activité de la souche bactérienne étudiée (*Bacillus pseudofirmus*, bactérie aérobie). Afin d'inclure des réserves d'air dans le milieu, nous avons réalisé des essais de moussage en testant plusieurs agents moussants différents sur la suspension épaissie finale. Ces réserves ont pour but d'éviter l'anaérobiose dans les parties de la fissure trop profondes pour que la diffusion d'oxygène dissous depuis la surface soit suffisante.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Suspensions épaissies étudiées

Les expérimentations ont été réalisées avec des additifs de différentes familles chimiques correspondant aux prérequis d'utilisation pour ce projet. Il doit donc s'agir de composés compatibles avec la croissance et l'activité bactériennes, dont la mise en œuvre et le prix permettent une utilisation à l'échelle réelle. Ceux-ci doivent en outre avoir un caractère rhéofluidifiant et/ou thixotrope, car ces propriétés rhéologiques favorisent l'injection et le maintien du fluide dans la fissure. Les épaississants étudiés ainsi que leur composition et leurs principales caractéristiques sont indiqués dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : Nature et propriétés des épaississants étudiés.

Epaississant	Fournisseur	Type	Composition	Propriétés des suspensions
Attagel 30, 40, 50 [172]	BASF	Argile (attapulgate /palygorskite)	Mélange commercial : 80-85 % attapulgate, 7-10 % montmorillonite, sépiolite et autres argiles, 5-7 % quartz, 3-5 % calcite et dolomite.	Rhéofluidifiant et thixotrope. Les grades plus hauts ont une finesse particulière plus élevée.
Bentonite [173]	VWR	Argile (bentonite, ratio Na/Ca inconnu)	Montmorillonite. Le ratio Sodium/Calcium des bentonites définit leur capacité de rétention d'eau et les propriétés rhéologiques des suspensions.	Rhéofluidifiant. Selon le type, les propriétés peuvent varier (thixotropie, fluide de Bingham)
Carraghénane (kappa) [174]	Sigma-Aldrich	Biopolymère (gomme)	Chaîne polysidique de D-galactopyranose, définie en types kappa, iota ou lambda selon la répartition des groupes fonctionnels.	Epaississants rhéofluidifiants. Les types kappa et iota peuvent former des gels vrais une fois chauffés.

Cimsil A55 / Pangel S9 [175]	Tolsa	Argile (sépiolite)	Phyllosilicate magnésien, formant des pseudo-feuillets de par sa structure fibreuse. Proche des palygorskites.	Rhéofluidifiant et thixotrope. Pangel S9 est un grade plus pur et plus performant que Cimsil A55.
Chitosane [176]	VWR	Biopolymère	Copolymère de glucosamine et N-acétyl glucosamine, dérivé de la chitine.	Epaississant à pH<6, gélifie à 35°C environ ou à pH 7.
Guar [177]	Sigma-Aldrich	Biopolymère (gomme)	Extrait végétal, composé de galactomannane.	Epaississant rhéofluidifiant, anionique.
Kaolin [178]	VWR	Argile (kaolinite impure)	Phyllosilicate d'aluminium, ayant une structure en feuillets.	Rhéofluidifiant thixotrope.
Xanthane [144]	Sigma-Aldrich	Biopolymère (gomme)	Chaîne de glucose, mannose, acide glucuronique et acide pyruvique, d'origine bactérienne.	Epaississant rhéofluidifiant, anionique.
Gellane [179]	Sigma-Aldrich	Biopolymère (gomme)	Chaîne de D-glucose, L-rhamnose, acide D-glucuronique (2 :1 :1) ; d'origine microbienne.	Gélifiant si chauffé à 80°C, épaississant à température ambiante. Anionique
Welan [180]	Kelco	Biopolymère (gomme)	Chaîne identique au gellane ramifiée de rhamnose et mannose ; d'origine microbienne.	Epaississant rhéofluidifiant, anionique.

Les suspensions sont préparées en duplicats dans l'eau distillée et dans une solution à 75 g/L de lactate de calcium et 47 g/L de nitrate de calcium. Cette solution correspond au milieu de culture LN de la bactérie étudiée, mais est dépourvu d'extrait de levure (milieu appauvri). L'absence d'extrait de levure dans le milieu appauvri permet d'étudier le comportement de suspensions durant plusieurs jours en limitant le développement possible de micro-organismes pouvant les altérer. Les suspensions sont préparées par dispersion à froid des poudres de chaque épaississant dans le milieu appauvri ou dans l'eau distillée, à l'exception du carraghénane et du chitosane. Le carraghénane est dispersé à 60°C puis refroidi à température ambiante sous agitation magnétique constante ; le chitosane est dissous par ajout progressif d'acide acétique puis ramené à pH 7 par ajouts progressifs de soude diluée.

Dans le cas des mélanges, les épaississants sont dispersés à froid séparément pour former des suspensions concentrées, puis ces dernières sont mélangées pour former le mélange. Cela réduit la formation de grumeaux et les difficultés liées à la dispersion d'une poudre sèche dans un milieu déjà épaissi. Les concentrations des suspensions des différents épaississants étudiés sont choisies de manière à ce que leurs viscosités soient comparables.

3.2.2. Caractérisation rhéologique des suspensions épaissies

Toutes les mesures et observations sont réalisées à 22°C +/- 2°C, avec une humidité relative de 25 % +/- 10 %. La stabilité des suspensions dans le temps est estimée dans un premier temps par une observation empirique des modifications des propriétés du milieu (floculation, décantation, gélification, épaississement). Ces observations sont réalisées sur une durée variable, dépendant de la stabilité de la suspension et d'une éventuelle colonisation par des microorganismes, étant donné que les essais ne sont pas réalisés en conditions stériles. Les tests de gélification sont réalisés dans des tubes Falcon de 50 mL, en laissant reposer plusieurs heures à plusieurs jours des suspensions préalablement agitées. La prise en gel est considérée comme effective s'il n'y a pas d'écoulement lorsque le tube est retourné ou qu'il y a un délai avant écoulement. Après constat de la prise en gel, le tube est agité à nouveau puis laissé au repos pour un nouveau test de gélification.

Les propriétés rhéologiques ne sont mesurées que pour les épaississants permettant d'obtenir des suspensions stables, homogènes et épaisses. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre à cylindres coaxiaux MCR 302 (Anton-Parr) muni d'un cylindre rotatif cannelé (CC27/P6, Anton-Parr), à 22°C. Le programme de mesure de la courbe d'écoulement (rhéogramme), exécuté à 22°C, consiste à réaliser une diminution du taux de cisaillement par paliers de 20 secondes aux taux de cisaillement de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 1 et 0.1 s⁻¹ précédée par un palier préparatoire de 20 secondes à un taux de cisaillement de 100 s⁻¹ (Figure 58). Cinquante mesures de la contrainte de cisaillement sont réalisées durant chaque palier sauf durant le palier préparatoire, durant lequel aucune mesure n'est réalisée. Seul le dernier point de chaque palier est pris en compte pour le tracé des rhéogrammes, car certaines suspensions peuvent avoir un comportement thixotrope et nécessiter un délai de stabilisation de la viscosité lorsque le taux de cisaillement est modifié.

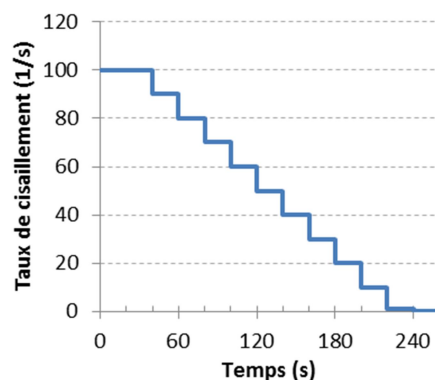


Figure 58 : Déroulement du programme de mesure de la rhéologie.

3.2.3. Essais de moussage des suspensions épaissies

Dans le but d'intégrer des réserves d'air dans la suspension épaissie et ainsi éviter l'anaérobiose dans les zones profondes des fissures, des essais de moussage sont réalisés sur le mélange WA. Des essais complémentaires sont réalisés dans le mélange épaissi à base d'eau distillée pour vérifier l'impact du calcium sur le processus de moussage.

Les essais de moussage sont réalisés sur quatre agents moussants, dans l'eau distillée et dans la suspension épaissie : le 12-HSA (acide 12-hydroxy stéarique, Sigma-Aldrich), le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate, Sigma-Aldrich), le Tween 80 (Sigma-Aldrich), et le BSA (Sigma-Aldrich). Les mousses de SDS, de Tween et de BSA sont préparées par ajout d'une solution concentrée d'agent moussant dans la suspension après que celle-ci ait été préparée. La mousse de 12-HSA est préparée suivant le protocole utilisé par Fameau *et al.* (2011) [181] : 4 % de 12-HSA sont ajoutés et chauffés à 80°C pour former une émulsion, puis 0,8 % d'éthanolamine sont ajoutés et la chauffe est maintenue durant 15 minutes sous agitation pour former la mousse. Le moussage est réalisé par vive agitation à la main d'un tube durant une minute.

La qualité de la mousse est ensuite estimée visuellement, par rapport au volume produit (volume final / volume initial), à la taille des bulles, et à sa dégradation sur plusieurs jours au repos (drainage, coalescence, disproportion). Les mousses les plus intéressantes sont caractérisées au rhéomètre en utilisant la même méthodologie de caractérisation que précédemment.

La mousse est considérée satisfaisante si elle est stable, homogène et abondante. La stabilité est le paramètre le plus important puisque la mousse doit se maintenir durant plusieurs heures,

idéalement plusieurs jours. L'homogénéité est un paramètre capital car les bulles doivent être réparties de manière homogène dans l'ensemble du fluide. Ces deux conditions assurent la présence de bulles d'air en tout point de la fissure durant le processus de biocicatrisation. Enfin, la mousse ne doit pas être excessivement abondante : un volume d'air entraîné trop important réduit le volume de milieu injecté et donc la quantité de nutriments disponibles pour la biocicatrisation, et crée une porosité non souhaitée dans la couche de biocicatrisation.

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Présélection des épaississants

La première étape de présélection des épaississants utilisés consiste à vérifier empiriquement que les épaississants étudiés puissent être utilisés dans le milieu de culture et à établir les protocoles et plages de concentration à employer. Les épaississants étudiés et leurs propriétés respectives sont présentés dans le Tableau 5. Les premiers essais de préparation de suspensions épaissies dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri permettent d'observer empiriquement leurs propriétés rhéologiques, qui sont décrits ci-dessous :

Methocel, guar, Welan et xanthane. Ces composés forment des suspensions épaissies homogènes stables et ont un pouvoir épaississant important : les suspensions deviennent des pâtes lorsque la concentration en épaississant avoisine 1 %. Ces épaississants se comportent de la même manière dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri.

Gellane. Dispersé à froid dans l'eau distillée, il se comporte comme le guar, le xanthane ou le Welan et forme une suspension épaissie homogène. Le Gellane a toutefois un pouvoir épaississant très inférieur à ces épaississants. Si la suspension est chauffée à 60°C, elle peut former un gel vrai lors de son refroidissement, de la même manière que de l'Agar. En revanche, le Gellane s'agglomère de manière irréversible en agrégats lorsqu'il est ajouté au milieu appauvri, et ne peut être correctement dispersé.

Carraghénane. Il nécessite une phase de chauffe à 60°C et a un comportement proche de l'Agar : s'il est agité en continu durant la phase de refroidissement, il peut donner une suspension épaissie plutôt qu'un gel. La température de prise dépend de la concentration : elle est de 40°C

environ pour les suspensions à 1,2 % de Carraghénane, et de 25°C pour les suspensions à 0,6 % de Carraghénane. Il se comporte de la même manière dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri.

Argiles. Les différentes argiles testées présentent des comportements différents :

- Les poudres d'Attigel sont aisées à disperser. Leur impact sur la viscosité est très faible tant que leur concentration est inférieure à 6 % et sont sujettes à la décantation pour des teneurs inférieures à 10 %. L'Attigel 50, grade le plus fin, a un pouvoir épaississant très supérieur à l'Attigel 30 ou 40. Les suspensions à 12 % d'Attigel 50 forment des gels au repos pouvant être fluidifiés par agitation. Une légère ségrégation est toutefois observable au bout de plusieurs heures. L'Attigel se comporte de la même manière dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri.
- La bentonite et le kaolin se dispersent aisément et forment des suspensions similaires à l'Attigel à forte concentration (15 %), mais ont un pouvoir épaississant et une stabilité très inférieures à l'Attigel et nécessitent des concentrations doublées pour un effet similaire. Dans le milieu appauvri, ces deux argiles s'agglomèrent en flocons de manière irréversible, les agrégats précipitent rapidement et ne provoquent pas d'augmentation de la viscosité.
- Les sépiolites Pangel et Cimsil ont un pouvoir épaississant comparable à l'Attigel 50 mais sont peu stables et la ségrégation des phases est observable en quelques minutes même pour des suspensions à 10 %, dont la viscosité devient celle d'une pâte. Ces argiles se comportent de la même manière dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri.

Chitosane. Dissous par ajout d'acide acétique puis ramené à pH neutre par ajout de soude, le chitosane forme des suspensions épaisses stables. Dans le milieu appauvri, la dissolution du chitosane est en revanche imparfaite et la neutralisation du milieu est sans effet.

Ces observations nous permettent d'éliminer les épaississants ne convenant pas à la conduite de ce projet. Le carraghénane, bien que présentant un comportement correspondant aux caractéristiques requises, n'est pas sélectionné du fait de son protocole de préparation plus complexe que pour les autres épaississants. Le kaolin, la bentonite, le gellane et le chitosane sont aussi abandonnés car ils sont incompatibles avec le milieu appauvri, vraisemblablement à cause de sa forte concentration en ions calcium. En effet, les ions calcium peuvent interagir avec les particules d'argile et annuler leur capacité à former un réseau, ce qui se traduit par leur précipitation et la perte de leur pouvoir épaississant. L'Attigel 30, l'Attigel 40, le Pangel et le Cimsil ne seront pas retenus, puisqu'ils

ont un pouvoir épaississant inférieur et sont plus sensibles à la décantation que l'Attigel 50. Cette première étape permet donc de sélectionner le guar, le xanthane, l'Attigel 50, le Welan et le Methocel pour caractériser les propriétés rhéologiques des suspensions réalisées avec ces épaississants. Seul l'Attigel 50 ayant été retenu parmi les différents grades étudiés (30, 40 et 50), celui-ci sera désigné par la suite comme Attigel, sans précision de grade.

La Figure 59 montre les rhéogrammes des suspensions préparées dans le milieu appauvri à partir des épaississants présélectionnés. Les mesures sont réalisées pour des suspensions à 0,4 % d'épaississant, sauf pour l'Attigel qui a été caractérisé à 4 % et à 8 % en raison de son faible pouvoir épaississant. Du fait de la bonne répétabilité des mesures (écart-types inférieurs à 2 %), les écart-types sont trop faibles pour être observables sur les rhéogrammes. Toutes les suspensions étudiées présentent une perte de viscosité lorsque le taux de cisaillement augmente, et les rhéogrammes obtenus s'apparentent à des courbes logarithmiques qui illustre leur caractère rhéofluidifiant (Figure 59, A). L'arc des courbes obtenues et la chute de la viscosité mesurée entre 0,1 et 100 s⁻¹ permettent de comparer le caractère rhéofluidifiant des suspensions étudiées, les suspensions les plus rhéofluidifiantes se caractérisant par un arc prononcé (Figure 59, A) et une forte diminution de viscosité lorsque le taux de cisaillement augmente (Tableau 6).

Il est ainsi possible de classer les suspensions de la plus rhéofluidifiante à la moins rhéofluidifiante : Attigel (8 %), xanthane (0,4 %), Welan (0,4 %), Attigel (4 %), guar (0,4 %) et Methocel (0,4 %). Avec une viscosité de 0,077 Pa.s à 100 s⁻¹ pour une suspension à 0,4 %, le Welan est l'épaississant ayant le plus fort pouvoir épaississant, suivi du xanthane (0,062 Pa.s), du guar (0,051 Pa.s) et du Methocel (0,022 Pa.s). L'Attigel a un très faible pouvoir épaississant, avec une viscosité de 0,077 Pa.s pour une suspension concentrée à 8 %, mais son fort caractère rhéofluidifiant en fait un épaississant intéressant. En effet, la suspension d'Attigel à 8 % voit sa viscosité divisée par 332 lorsqu'elle est soumise à une agitation, cette suspension présente donc une très forte viscosité au repos bien qu'elle ait une viscosité similaire aux autres à un taux de cisaillement de 100 s⁻¹.

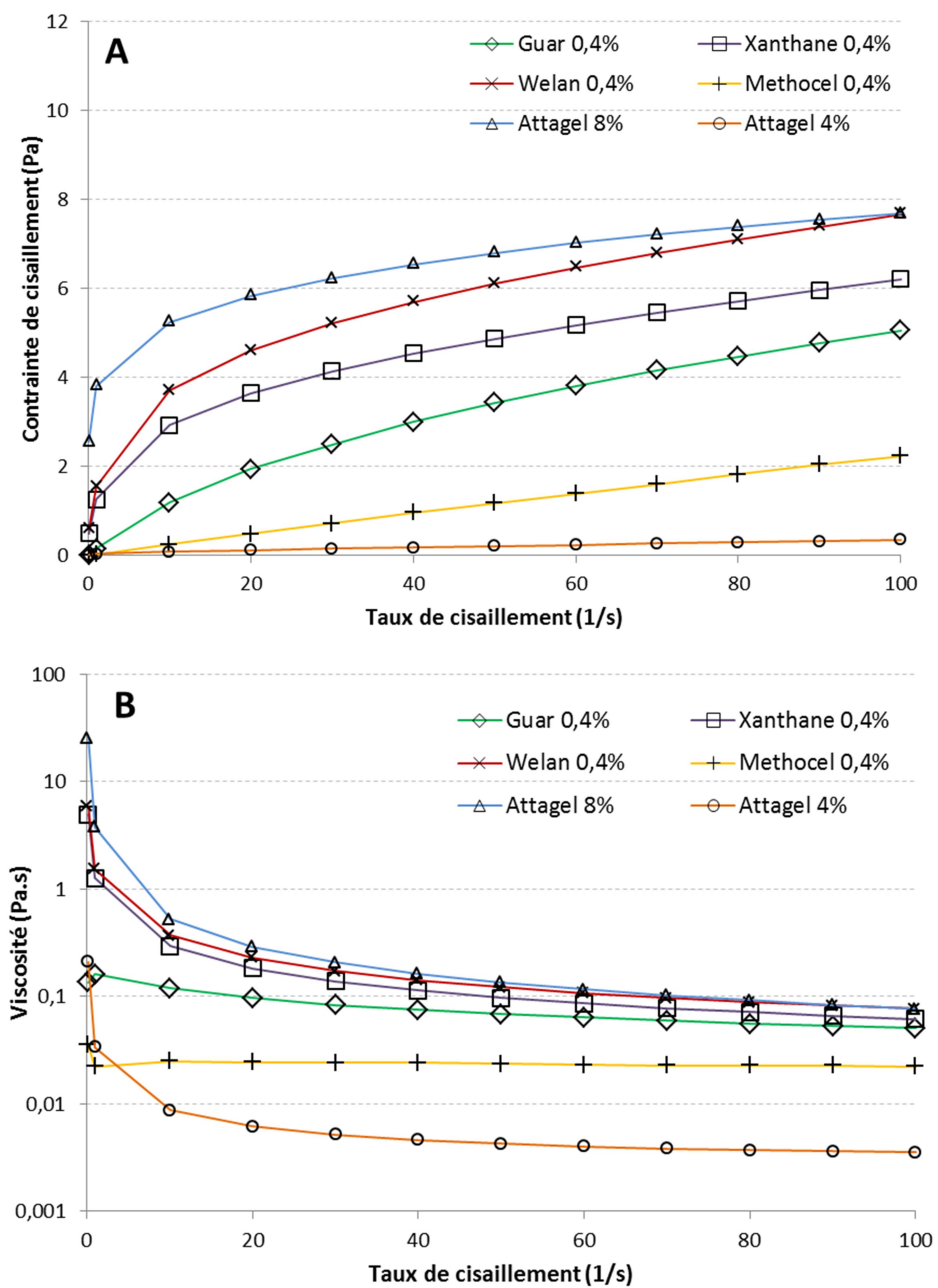


Figure 59: Rhéogrammes en décélération des suspensions des différents épaississants présélectionnés. A – Contrainte de cisaillement ; B – Viscosité.

Tableau 6 : Chute de viscosité entre 0,1 et 100 s⁻¹ des suspensions étudiées.

Suspension	Guar (0,4 %)	Xanthane (0,4 %)	Welan (0,4 %)	Attagel (8 %)	Attagel (4 %)	Methocel (0,4 %)
Viscosité à 0,1 s ⁻¹ (Pa.s)	0,14	4,99	5,91	25,58	0,21	3,55.10 ⁻²
Viscosité à 100 s ⁻¹ (Pa.s)	5,06.10 ⁻²	6,21.10 ⁻²	7,67.10 ⁻²	7,69.10 ⁻²	3,55.10 ⁻²	2,24.10 ⁻²
Chute de viscosité	2,7	80	77	332	60	1,4

Afin de comparer plus précisément ces suspensions, les mesures rhéologiques sont utilisées pour vérifier la corrélation entre le comportement des suspensions et le modèle d'Ostwald. Le modèle d'Ostwald définit le comportement pseudoplastique (rhéofluidifiant) d'un fluide par rapport à la relation suivante :

$$\eta = k * \gamma^{n-1} \quad (27)$$

Où η est la viscosité apparente et γ le taux de cisaillement. Ce modèle est une loi en puissance basée sur deux paramètres, l'indice d'écoulement (n) et l'indice de consistance (k).

L'indice d'écoulement définit le comportement du fluide : si $n=1$, le fluide est Newtonien ; une valeur comprise entre 0 et 1 correspond à un comportement rhéofluidifiant tandis qu'une valeur supérieure correspond à un comportement rhéoépaississant. L'indice de consistance est égal à la viscosité du fluide à 1 s⁻¹, et reflète son « épaisseur » empirique. Les paramètres sont déterminés par régression linéaire de la courbe du logarithme népérien de la viscosité en fonction du logarithme népérien du taux de cisaillement.

Tableau 7 : Paramètres rhéologiques des suspensions présélectionnées selon le modèle d'Ostwald.

Suspension	k	n	R ²
Guar 0,4 %	0,13	0,839	0,768
Methocel 0,8 %	0,10	0,951	0,683
Attagel 8 %	3,70	0,156	1
Welan 0,4 %	1,47	0,365	0,998
Xanthane 0,4 %	1,21	0,359	0,999

A l'exception du Methocel et du guar, les suspensions étudiées montrent une forte corrélation avec le modèle d'Ostwald avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,9, ces suspensions ont donc un comportement pseudoplastique :

- Le Methocel et le guar ne correspondent pas au modèle d'Ostwald ($R^2 < 0,8$) et ont un indice d'écoulement calculé proche de 1, leur comportement est donc proche de celui de fluides Newtoniens.
- L'Attigel a l'indice d'écoulement le plus faible avec $n = 0,156$, les gomme Welan et xanthane ont des caractéristiques proches ($n = 0,365$ et $n = 0,359$, respectivement).

Des mesures réalisées sur des suspensions plus concentrées de ces épaississants (0,5 %) révèlent que leur comportement pseudoplastique augmente avec la concentration en épaississants, ce qui se traduit par une diminution du coefficient n et une augmentation de R^2 . Le coefficient k augmente également, les suspensions plus concentrées étant plus épaisses.

La caractérisation des suspensions étudiées à l'aide du modèle d'Ostwald confirme les observations réalisées sur les rhéogrammes des suspensions étudiées :

- l'Attigel est très rhéofluidifiant mais présente un faible pouvoir épaississant.
- Le Welan et le Xanthane sont aussi fortement rhéofluidifiants et présentent un fort pouvoir épaississant.
- Peu rhéofluidifiants, le Methocel et le guar ne sont pas des épaississants intéressants pour la formulation d'un milieu d'injection. Toutefois, la facilité d'utilisation du Methocel et sa stabilité en font un témoin intéressant pour la mise au point du système d'injection. On utilisera donc des suspensions de Methocel préparées dans l'eau distillée comme référence pour étudier les suspensions épaissies lors des essais d'injection dans les mortiers fissurés.

Afin de pouvoir établir un lien entre la viscosité des suspensions et leur injectabilité, le rhéogramme des suspensions de Methocel utilisées pour les essais d'injection a été réalisé. La Figure 60 présente les rhéogrammes de suspensions de Methocel pour des concentrations comprises entre 0,4 % et 1,5 %.

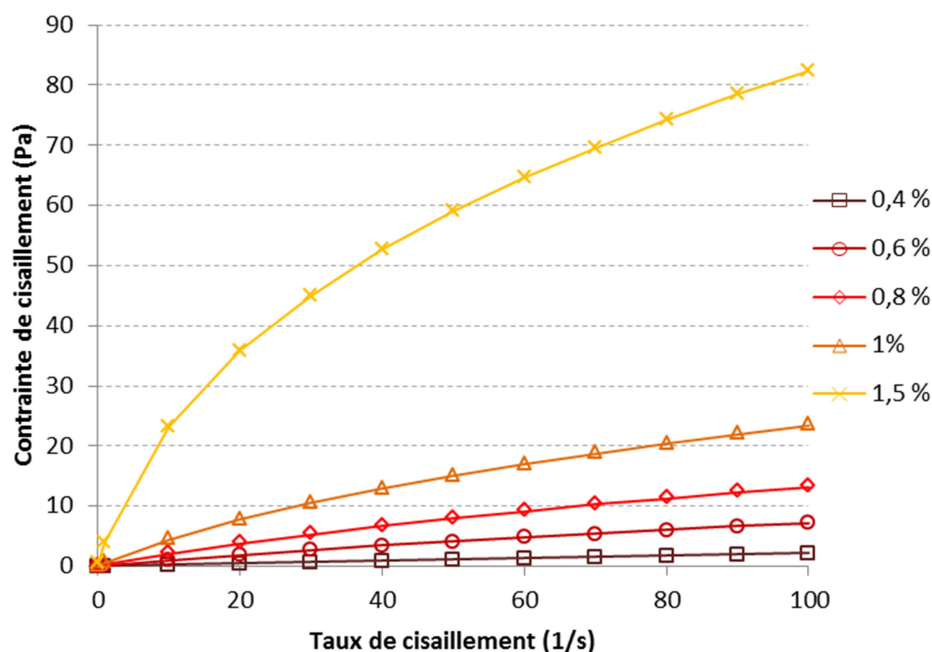


Figure 60 : Rhéogramme des suspensions de Methocel utilisées comme références pour les essais d'injection.

3.3.1.1. Conclusion

Au cours de ces essais, plusieurs épaississants ont été évalués pour leur capacité à former une suspension rhéofluidifiante dans le milieu appauvri. Il a pu être observé que plusieurs d'entre eux ne permettent pas d'obtenir une suspension stable dans ce milieu, vraisemblablement à cause de sa forte teneur en ions calcium. Ainsi, ces essais ont permis de supprimer le gellane, le carraghénane, le kaolin, la bentonite et le chitosane pour ne retenir que cinq épaississants potentiels : L'Attagel, le xanthane, le Welan, le guar et le Methocel. Ces épaississants ont été comparés par rapport aux caractéristiques souhaités pour ce projet, c'est-à-dire un comportement rhéofluidifiant et thixotrope, et classés à l'aide de la loi d'Ostwald du plus rhéofluidifiant au moins rhéofluidifiant dans l'ordre suivant : Attagel, xanthane, Welan, guar et Methocel.

L'Attagel semble donc le plus indiqué pour la préparation du milieu épaissi, mais est peu stable (sensible à la décantation) et a un faible pouvoir épaississant. En effet, de fortes concentrations sont nécessaires pour obtenir une augmentation significative de la viscosité et rendre la suspension moins sensible à la décantation, ce qui représente des contraintes de coût et de mise en œuvre. Il est donc nécessaire de mettre au point une formulation contenant de l'Attagel en mélange avec d'autres

épaississants, de manière à obtenir une suspension stable, épaisse, rhéofluidifiante et thixotropique. Le guar et le Methocel sont en revanche peu rhéofluidifiants et présentent donc moins d'intérêt.

3.3.2. Essais de préparation de formulations

Les mélanges épaissis sont des suspensions obtenues par mélange de biopolymères et d'Attigel, exploitant les potentielles synergies entre composés. Différentes combinaisons sont réalisées à partir des épaississants sélectionnés dans les essais précédents, afin d'étudier la possibilité de créer des suspensions plus performantes qu'avec les composés seuls.

Une observation empirique est réalisée dans un premier temps sur des suspensions contenant entre 0,2 et 0,4 % de biopolymère et 4 à 8 % d'Attigel pour évaluer l'homogénéité, la stabilité et le comportement général des suspensions ainsi préparées. Les suspensions homogènes, stables et rhéofluidifiantes feront par la suite l'objet d'une caractérisation au rhéomètre de leurs propriétés rhéologiques à différentes concentrations. La composition des différents mélanges testés et leurs principales caractéristiques rhéologiques sont résumées dans le Tableau 8 :

Tableau 8 : Principales propriétés rhéologiques des mélanges biopolymère-Attigel testés.

Biopolymère utilisé	Guar	Methocel	Xanthane	Welan
Comportement du mélange biopolymère-Attigel	Floculation et perte de viscosité.	Mélange homogène, décantation lente.	Mélange homogène, pas de décantation, viscosité fortement augmentée, formation de pseudo-gel.	

Mélange guar-Attigel. La suspension mélangée est instable pour toutes les concentrations en épaississants testées : peu après dispersion des poudres, l'argile s'agglomère en particules de petite taille qui décantent après moins de 24 heures de repos. La formation de ces agrégats se traduit par une forte baisse de viscosité et par l'hétérogénéité de la suspension.

Mélange Methocel-Attigel. Le mélange est homogène pour toutes les concentrations en épaississants testées mais ses propriétés rhéologiques ne diffèrent pas notablement de la suspension de Methocel pur, sauf à plus de 6 % d'Attigel. La décantation de l'argile est ralentie mais peut être

observée après quelques heures. Le ralentissement de la décantation observé dans les mélanges Methocel-Attigel est probablement dû à la viscosité du milieu, qui ralentit physiquement les particules sans qu'il n'y ait d'interaction moléculaire entre les deux épaississants.

Mélange Xanthane-Attigel et Welan-Attigel (Figure 61). Les deux mélanges permettent de préparer des suspensions homogènes pour toutes les concentrations en épaississants testées ; les deux épaississants doivent néanmoins être dispersés séparément avant d'être mélangés. A un taux de cisaillement de 1 s^{-1} , une suspension de 0,4 % de xanthane avec 4 % d'Attigel a une viscosité 2,9 fois plus élevée qu'une suspension de xanthane seul à 0,4 %. Pour le Welan, la viscosité à 1 s^{-1} est 3,4 fois supérieure pour une suspension à 0,4 % de Welan et 4 % d'Attigel que pour une suspension à 0,4 % de Welan. Dans les deux cas, le mélange entre gomme et argile semble donc augmenter la viscosité de la suspension de manière significative. Pour le Welan aussi bien que pour le xanthane, la suspension est stabilisée : il n'y a pas de décantation ou de ségrégation observable au bout de 7 jours, alors que la décantation est complète en 24 h pour une suspension d'Attigel seul à 4 %. Des essais de gélification sur des suspensions à 8 % d'Attigel et 0,4 % de Welan ou de xanthane montrent un épaississement progressif menant à la formation d'un gel au bout de quelques heures, pouvant être temporairement déstructuré par agitation.

Les suspensions ont donc toutes deux un comportement fortement thixotropique et rhéofluidifiant. Leurs propriétés rhéologiques ne sont pas dégradées par un grand nombre de cycles de repos/agitation, elles conservent donc leur capacité à se gélifier au repos même après avoir été stockées et agitées plusieurs fois. On observe néanmoins une légère ségrégation des phases dans les suspensions à 8% d'Attigel et 0,2% de Xanthane ou 0,2 % de Welan. Le xanthane et le Welan sont donc des épaississants semblables, permettant d'obtenir par mélange avec de l'Attigel des suspensions stables, rhéofluidifiantes et thixotropiques, avec une viscosité importante.

Ces essais permettent de conclure sur les antagonismes et synergies entre l'Attigel et les biopolymères utilisés. L'Attigel et le guar sont antagonistes et leur mélange dégrade les propriétés rhéologiques de la suspension, tandis que l'Attigel ne présente pas ou peu d'interactions avec le Methocel et ne conduit pas à une amélioration des propriétés rhéologiques de la suspension. Enfin, le Welan aussi bien que le xanthane présentent une synergie avec l'Attigel, ce qui permet de préparer des suspensions épaisses, stables, fortement rhéofluidifiantes et thixotropiques.

Les synergies fortes observées entre le xanthane ou le Welan avec l'Attagel témoignent d'une réelle interaction chimique entre les deux épaississants et sont cohérentes avec les observations de Ciullo (1981) [150], qui met en évidence une synergie biopolymère-argile sur un mélange xanthane-smectite. On ne réalisera donc une caractérisation rhéologique que sur les mélanges xanthane-Attagel et Welan-Attagel. Afin de les départager et de choisir le mélange le plus performant, deux suspensions ayant les mêmes teneurs en épaississants sont caractérisées.

Les rhéogrammes obtenus précédemment (Figure 59, B) pour les suspensions de Welan et de xanthane seuls révèlent que le Welan a un pouvoir épaississant plus fort que le xanthane, une suspension de Welan à 0,4 % ayant une viscosité 1,2 fois supérieure à une suspension de xanthane de même concentration. Le Xanthane et le Welan ont des propriétés rhéologiques très proches, avec des indices d'écoulement (n) respectivement égaux à 0,369 et 0,365 pour des suspensions à 0,4 % (Tableau 7).

Les rhéogrammes des mélanges (Figure 61) confirment la différence de pouvoir épaississant entre les deux gommes : à 100 s^{-1} , les suspensions de Welan-Attagel et de xanthane-Attagel contenant 0,4 % de gomme et 4 % d'Attagel ont une viscosité de 0,170 Pa et 0,139 Pa respectivement ; à $0,1 \text{ s}^{-1}$ leurs viscosités sont 28,69 Pa et de 17,88 Pa. Les mélanges ont une viscosité accrue par rapport aux suspensions pures : à $0,1 \text{ s}^{-1}$ la viscosité du mélange xanthane-Attagel est 3,6 fois supérieure à celle de la suspension à 0,4 % de xanthane et ce ratio s'élève à 4,9 pour le mélange Welan-Attagel par rapport la suspension à 0,4 % de Welan. A partir de 10 s^{-1} et pour les deux mélanges, la viscosité du mélange est 2,2 à 2,5 fois supérieure à celle de la gomme seule, tandis que suspension d'Attagel seul à 4 % a une viscosité très faible et décante rapidement.

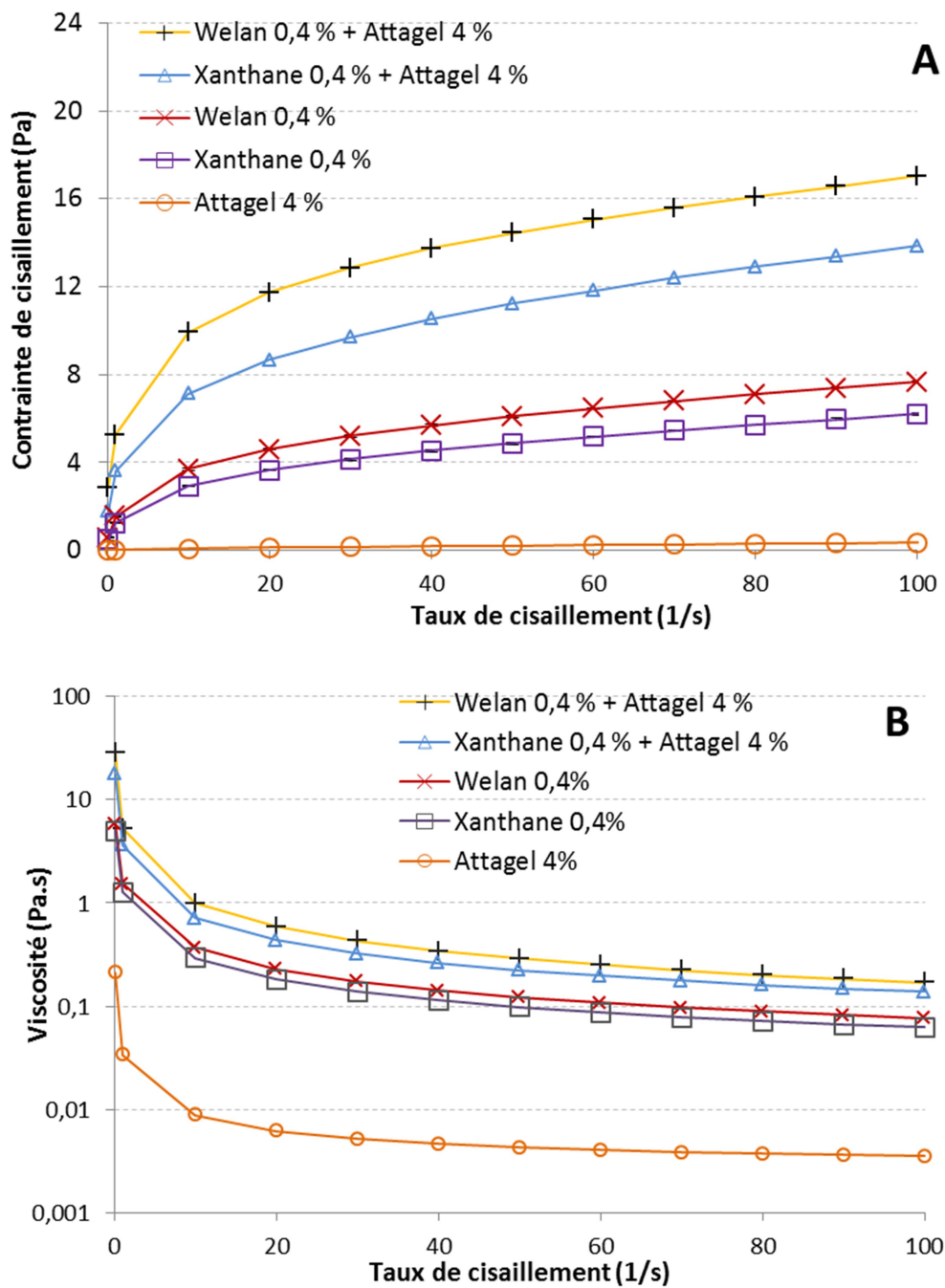


Figure 61: Rhéogrammes des suspensions d'Attagel avec du Xanthane ou du Welan, seuls ou en mélange. A – Contrainte de cisaillement ; B – Viscosité.

L'application du modèle d'Ostwald sur les suspensions étudiées conduit aux résultats résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Paramètres rhéologiques des mélanges sélectionnés selon le modèle d'Ostwald.

Suspension	k	n	R ²	Viscosité à 0,1 s ⁻¹ (Pa.s)	Viscosité à 100 s ⁻¹ (Pa.s)	Chute de viscosité
Welan 0,4 %	1,47	0,365	0,998	5,91	7,67.10 ⁻²	77
Xanthane 0,4 %	1,21	0,359	0,999	4,99	6,21.10 ⁻²	80
Attagel 4 %	0,04	0,421	0,981	0,21	3,55.10 ⁻³	60
Welan 0,4 % + Attagel 4 %	5,29	0,257	0,999	28,7	0,170	169
Xanthane 0,4 % + Attagel 4 %	3,57	0,294	1	17,9	0,138	129

Les mélanges ont des indices d'écoulement inférieurs aux suspensions simples : n diminue de 0,07 environ pour le mélange xanthane-Attagel, et de 0,11 environ pour le mélange Welan-Attagel, les mélanges sont donc plus rhéofluidifiants que les suspensions ne contenant qu'un épaississant. Le mélange Welan-Attagel a un indice d'écoulement inférieur au mélange xanthane-Attagel alors que les gommes pures ont des indices d'écoulement proches. Les indices de consistance des mélanges sont largement supérieurs à ceux des gommes seules, confirmant l'observation que la viscosité est fortement augmentée par le mélange entre gomme et argile. A l'instar des suspensions simples, les mélanges ont un comportement pseudoplastique bien représenté par le modèle d'Ostwald, les coefficients de détermination étant égaux ou supérieurs à 0,999.

Les essais de moussage réalisés révèlent des différences de comportement entre les différents agents moussants testés :

- L'acide 12-hydroxystéarique (12-HSA) permet d'obtenir dans l'eau distillée une mousse fine et stable plusieurs jours, mais dans le milieu appauvri celui-ci précipite pour former des particules millimétriques.
- Le dodécylsulfate de sodium (SDS) permet d'obtenir une mousse fine et stable dès 0,15 % de la masse de suspension dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri, mais réduit sa viscosité.
- Le Tween 80 produit dans l'eau distillée et dans le milieu appauvri une mousse médiocre, peu stable et sensible au phénomène de coalescence.

- L'albumine de sérum bovin (BSA) piège quant à elle de nombreuses bulles fines ($< 0,5$ mm) et forme une mousse fine stable durant plusieurs jours. L'effet moussant semble légèrement supérieur dans le milieu appauvri que dans l'eau distillée mais trop peu pour être confirmé par une simple observation empirique.

Les essais réalisés ont ainsi permis d'éliminer le 12-HSA (déstabilisé par le calcium) et le Tween 80 (faible effet moussant). En outre, le SDS est un détergent anionique cytotoxique par nature et sera donc écarté [182]. Seul le BSA est donc retenu.

Toutefois, les mannoprotéines naturellement présentes dans l'extrait de levure peuvent jouer le rôle d'agent moussant protéique: le milieu d'injection est donc faiblement moussant par nature, propriété absente du milieu appauvri. Le milieu d'injection peut donc être utilisé en l'état ou être dopé en BSA pour obtenir un moussage supérieur si cela est nécessaire. Etant un nutriment communément utilisé en microbiologie, il est biocompatible et peut fournir un complément nutritif dans le milieu.

La caractérisation rhéologique du mélange Welan-Attagel additionné de BSA dans le milieu appauvri est réalisée, afin de quantifier les effets de l'agent moussant sur la suspension. Cet essai est réalisé avec des suspensions contenant 0,4 % de Welan et 6 % d'Attagel car celles-ci ont présenté une capacité de moussage supérieure à celles contenant 0,4 % de Welan et 4 % d'Attagel. Les rhéogrammes obtenus (Figure 62) montrent que l'ajout de 0,5 % de BSA dans le mélange WA 46 diminue légèrement la viscosité de la suspension. En effet, à 100 s^{-1} , la viscosité de la suspension WA46 B5 est de $0,263\text{ Pa.s}$, contre $0,296\text{ Pa.s}$ en l'absence de BSA, soit une diminution de 11 %. Les mesures de viscosité obtenues avec les deux suspensions peuvent être corrélées au modèle d'Ostwald avec un coefficient de détermination supérieur à 0,999. La présence de BSA dans WA 46 réduit l'indice de consistance k de 10,14 à 8,93 et l'indice d'écoulement n de 0,229 à 0,206.

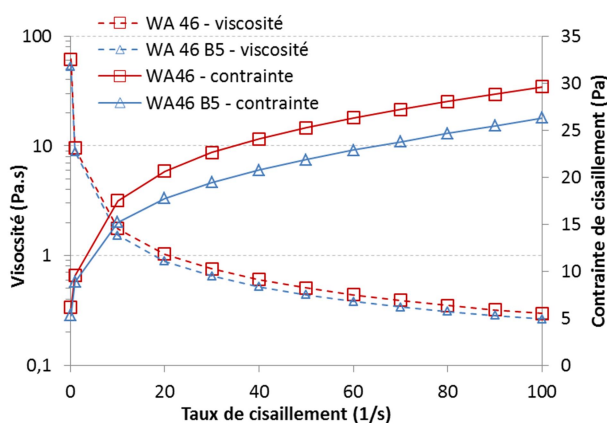


Figure 62 : Rhéogramme en décélération de la suspension contenant 0,4 % de Welan et 6 % d'Attagel (WA46) avec et sans ajout de 0,5% de BSA.

Cette mousse est stable, la densité et la taille des bulles n'évoluant pas au bout de 2 jours et aucun phénomène de ségrégation n'ayant été observé. La Figure 63 montre la distribution des bulles dans une suspension avec et sans BSA. Il faut noter que sur ces clichés les bulles sont grossies par l'écrasement entre deux lames de microscopie.



Figure 63 : Suspensions contenant 0.4 % de Welan et 6 % d'Attagel, piégées entre deux lames de microscopie.

A gauche : sans ajout de BSA (WA46), à droite : avec 0,5 % de BSA (WA46 B5).

L'ajout de BSA est donc retenu comme une solution potentielle en cas de mauvaise oxygénation des fissures, cet agent moussant ayant un effet peu important sur les propriétés rhéologiques du mélange WA. Le BSA diminue en effet légèrement la viscosité de la suspension et augmente son caractère rhéofluidifiant, ce qui se traduit par une légère diminution des coefficients k et n de l'équation représentant cette suspension suivant le modèle d'Ostwald. Cette réduction de viscosité peut être due à un effet de « roulement à billes » des bulles d'air dans la suspension [183]. Le BSA permet d'incorporer de manière homogène des bulles très fines dans la suspension, bulles qui se maintiennent dans cet état durant plusieurs jours. Le volume d'air incorporé reste limité, ce qui permet de maintenir un grand volume de liquide dans la fissure et donc une quantité maximale de précurseur disponible pour la biominéralisation.

3.3.2.1. Conclusion

Les mélanges Welan-Attigel et xanthane-Attigel présentent des propriétés proches dues à la similarité des compositions chimiques du Welan et du xanthane et ne peuvent être départagés par des observations empiriques. Ils présentent en effet tous deux une forte synergie avec l'Attigel, ce qui se traduit par la possibilité de préparer des suspensions plus épaisses, plus rhéofluidifiantes, plus thixotropiques et plus stables qu'avec un seul épaississant. Leur caractérisation rhéologique à l'aide du modèle d'Ostwald a permis de révéler les différences entre Welan et xanthane : le Welan a un effet épaississant plus fort et permet à concentrations égales d'obtenir une plus grande viscosité qu'avec le xanthane. De plus, le Welan semble présenter une synergie supérieure avec l'Attigel. En effet, le mélange Welan-Attigel est plus rhéofluidifiant que le mélange xanthane-Attigel, alors que les suspensions de gommes seules ont des indices d'écoulement similaires. Nous avons donc sélectionné le mélange Welan-Attigel comme formulation pour la mise au point d'une méthode d'exobiocicatrisation.

Enfin, les essais de moussage réalisés sur le mélange Welan-Attigel ont montré qu'il est possible de produire une mousse par ajout de BSA au mélange sans que ses propriétés rhéologiques ne soient perdues. Il est donc possible de facilement transformer la suspension d'injection en une mousse apportant des réserves en oxygène en profondeur dans la fissure et éviter que la biocicatrisation ne soit limitée par une possible anaérobiose. Cette propriété moussante étant déjà faiblement observable en présence d'extrait de levure, le BSA ne sera pas ajouté à la suspension d'injection au cours de ce projet.

CHAPITRE 4.

Formulation et caractérisation rhéologique de la suspension d'injection épaissie

4.1. Introduction

Le mélange Welan-Attagel étant sélectionné pour les essais de biocicatrisation, une caractérisation rhéologique est réalisée dans les mêmes conditions que pour les essais de croissance bactérienne et de biominéralisation. Par rapport aux essais de présélection d'épaississants, l'application de ces conditions implique deux différences majeures :

- D'une part, de l'extrait de levure est présent dans le milieu LNG, et le milieu appauvri n'est plus utilisé. Un léger effet moussant est observé dans le milieu contenant l'extrait de levure, probablement dû à l'action des mannoprotéines qu'il contient, ce qui se traduit par une légère réduction de la viscosité de la suspension, comme observé avec le BSA (Figure 62).
- D'autre part, les poudres d'épaississants sont autoclavées avant dispersion, afin d'éviter les contaminations par des microorganismes. Le processus de stérilisation par autoclave dégrade en partie le Welan et réduit par conséquent légèrement la viscosité des suspensions obtenues.

Outre la caractérisation des propriétés rhéologiques du mélange Welan-Attagel, cet essai vise à affiner le choix de la concentration en épaississants en testant une large gamme de concentrations, afin de choisir un mélange présentant les propriétés rhéologiques souhaitées (comportement rhéofluidifiant et thixotropique). Cette caractérisation inclut le tracé de rhéogrammes et leur utilisation pour quantifier les propriétés des suspensions à l'aide du modèle d'Ostwald, ainsi qu'une mesure de la thixotropie. Un programme de mesure du caractère thixotrope des suspensions est en effet utilisé, afin de connaître et comparer la vitesse et l'ampleur du regain de viscosité au repos qui avait été observé lors des observations empiriques précédentes. Cette analyse dynamique de la rhéologie des suspensions peut fournir des informations importantes pour la mise en œuvre du procédé. En effet, la vitesse et l'ampleur du regain de viscosité de la suspension au repos peuvent avoir un impact important sur la mise en œuvre de l'injection.

Le choix des concentrations optimales en épaississants dans la suspension d'injection est ensuite réalisé à l'aide d'essais d'injection dans des éprouvettes de mortier fissurées. Au cours de ces essais, les formulations sélectionnées à l'aide du modèle d'Ostwald sont injectées dans des fissures d'ouvertures comprises entre 100 et 1000 μm , afin de déterminer la plage d'utilisation complète de chacune des suspensions, permettant par la suite de sélectionner la plus adaptée à une injection dans des fissures d'ouverture comprise entre 150 et 500 μm . L'observation de la résistance à l'écoulement des fissures et du drainage post-injection permettent d'établir un lien entre les propriétés rhéologiques des suspensions et l'efficacité d'injection en fonction de l'ouverture des fissures. Enfin, une caractérisation de la nature et de la structure du dépôt formé à l'intérieur des fissures par la suspension d'injection a été réalisée.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Caractérisation rhéologique des suspensions testées

L'Attagel et le Welan sont identiques à ceux employés pour les essais de sélection des épaississants. Les données du fournisseur (BASF) [184] indiquent que l'Attagel est composé de 65,2 % de SiO_2 , 12,7 % de Al_2O_3 , 12,3 % de MgO , 3,5 % de Fe_2O_3 , 3,9 % de CaO , et 2,4% d'éléments mineurs dont P_2O_5 (1 %), K_2O (0,8 %) et TiO_2 (0,5 %). La taille moyenne particulaire est de 0,1 μm , la perte au feu du matériau est de 10 % à 650 °C, et de 24 % à 1000°C. Le Welan (Kelco) est quant à lui formé d'une chaîne polymérique de glucose porteuse de ramifications rhamnose et mannose. La molécule, d'une masse moléculaire approximative de 10^6 g/mol, contient les unités l-mannose, l-rhamnose, d-glucose, et acide d-glucuronique aux ratios molaires 1.0:4.5:3.1:2.3 [185].

Les essais sont réalisés sur des suspensions contenant (en masse) 0,2 à 0,4 % de Welan et 4 à 8 % d'Attagel, préparées par mélange de suspensions concentrées stériles. Pour 200 mL de suspension à 0,3 % de Welan et 6 % d'Attagel, le protocole de préparation est le suivant, réalisé en conditions stériles :

- a. Stérilisation séparée des poudres de Welan et d'Attagel par autoclave (120°C durant 15 minutes) ;
- b. Stérilisation de 200 mL milieu LNG par filtration à 0,22 μm ;

- c. Dispersion à froid de 0,6 g de Welan dans 99,4 g de milieu LNG ;
- d. Dispersion à température ambiante de 12 g d'Attigel dans 88 g de milieu LNG ;
- e. Mélange des deux suspensions.

Les suspensions sont caractérisées à 22°C une heure après préparation à l'aide d'un rhéomètre à cylindres coaxiaux Anton-Parr MCR 302 équipé d'un cylindre cannelé modèle CC27/P6, suivant deux programmes lancés consécutivement. Le programme de mesure de la courbe d'écoulement (rhéogramme), lancé en premier, consiste à réaliser une augmentation du taux de cisaillement par paliers de 20 secondes aux taux de cisaillement 0,1, 1, 10, 50, 100, 250, 500 s^{-1} , puis une diminution suivant les mêmes paliers, avec 50 mesures par palier (Figure 64).

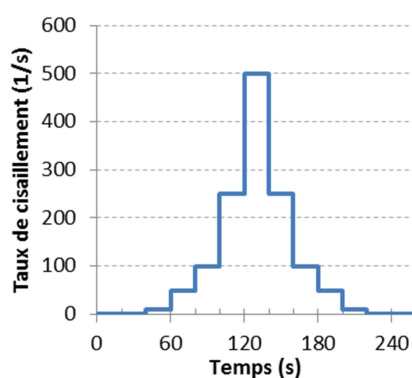


Figure 64 : Déroulement du programme de mesure de la rhéologie pour la caractérisation du mélange Welan-Attigel.

Le programme de mesure de la thixotropie consiste en une période de 100 secondes de repos (oscillation, amplitude : 0,001 %, fréquence angulaire : 10 s^{-1}), suivie d'une période de déstructuration de 60 secondes à un taux de cisaillement de 500 s^{-1} , puis d'une période de repos (oscillation, amplitude : 0,001 %, fréquence angulaire : 10 s^{-1}) de 10 minutes (Figure 65).

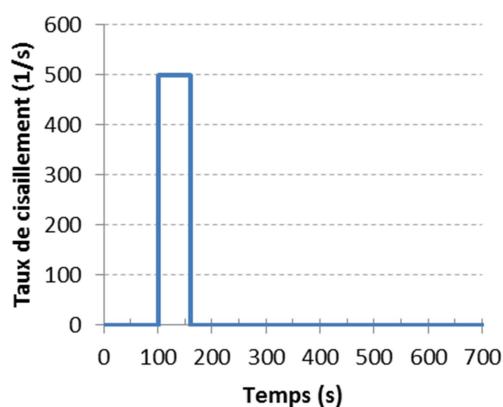


Figure 65 : Déroulement du programme de mesure de la thixotropie.

Afin de déterminer quelles concentrations étudier, nous avons construit un plan d'expérience en deux étapes. Dans une première étape, nous avons établi une matrice de Hadamard (Tableau 10) afin de définir les limites des concentrations à étudier, puis celle-ci a été utilisée pour construire un plan composite à deux facteurs (Tableau 11) permettant de construire un graphique de surface de réponse du comportement des suspensions en fonction des teneurs de chaque épaississant.

La première série de mesures comporte quatre suspensions dont les concentrations en épaississants sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Matrice de Hadamard pour l'étude des suspensions Welan-Attigel.

N	Welan (%)	Attigel (%)
1	0,2	4
2	0,2	8
3	0,4	4
4	0,4	8

Suite aux résultats obtenus pour ces quatre échantillons, un plan composite à deux facteurs (Welan et Attigel) et trois variables (concentrations en épaississants) pour chaque facteur a été construit, neuf suspensions différentes ont ainsi été choisies pour être caractérisées (Tableau 11). Les résultats issus des deux plans d'expérience sont combinés pour obtenir un graphique de réponse de la viscosité des suspensions étudiées en fonction de la concentration de chaque épaississant. Toutefois, il est nécessaire d'ajouter deux points de mesure complémentaires pour obtenir un graphique complet : la suspension WA34 contenant 0,3 % de Welan et 4 % d'Attigel et la suspension WA38 contenant 0,3 % de Welan et 8 % d'Attigel.

Tableau 11 : Plan d'expérience composite pour l'étude des suspensions Welan-Attigel.

N° et nom d'échantillon	Welan (% et valeur du facteur)		Attigel (% et valeur du facteur)	
1 : WA 25	0,2	-1	5	-1
2 : WA 35	0,3	0	5	-1
3 : WA 45	0,4	+1	5	-1
4 : WA 26	0,2	-1	6	0
5 : WA 36	0,3	0	6	0
6 : WA 46	0,4	+1	6	0
7 : WA 27	0,2	-1	7	+1
8 : WA 37	0,3	0	7	+1

9 : WA 47	0,4	+1	7	+1
-----------	-----	----	---	----

4.2.2. Préparation des éprouvettes de mortier fissurées

Les échantillons sont réalisés dans un mortier dont la composition et la préparation suivent la norme ASTM C109M, avec un rapport Eau/Ciment de 0,485 et Sable/Ciment de 2,75. Le sable utilisé est du sable normalisé d'Ottawa, respectant la norme C778. Il s'agit de grains de silice naturelle, de granulométrie comprise entre 150 μm (tamis n°100) et 600 μm (tamis n°30). Sa densité est de 2,65. Le ciment est un ciment Portland de type GU (usage général), de finesse Blaine 381 m^3/kg . Le Tableau 12 et le Tableau 13 présentent respectivement la composition chimique et la composition minéralogique du ciment utilisé.

Tableau 12 : composition en oxydes du ciment utilisé.

Oxydes	Notation cimentière	Teneur massique (%)
CaO	C	63,1
SiO ₂	S	20,3
Al ₂ O ₃	A	4,4
Fe ₂ O ₃	F	2,4
FeO	-	2,2
SO ₃	\bar{S}	3,5

Tableau 13 : composition minéralogique du ciment étudié.

Phase minérale (notation cimentière)	C ₃ S	C ₂ S	C ₃ A	C ₄ AF
Teneur massique	60 %	13 %	7,5 %	7 %

Les éprouvettes de mortier sont réalisées selon la procédure décrite par Argouges (2010) [23]. La procédure de malaxage du mortier suit la norme ASTM C305. Le mortier est coulé dans des moules cylindriques de diamètre intérieur 150 mm et de hauteur 50 mm, au centre desquels sont fixés des cylindres en téflon de 55 mm. Chaque moule est muni d'un anneau d'acier de 4,8 mm de diamètre et de 95,2 mm de diamètre intérieur, maintenu à mi-hauteur par trois attaches de fil de nylon (Figure 66). Cette armature métallique permet de maintenir la cohésion de l'échantillon après la fissuration de l'éprouvette.

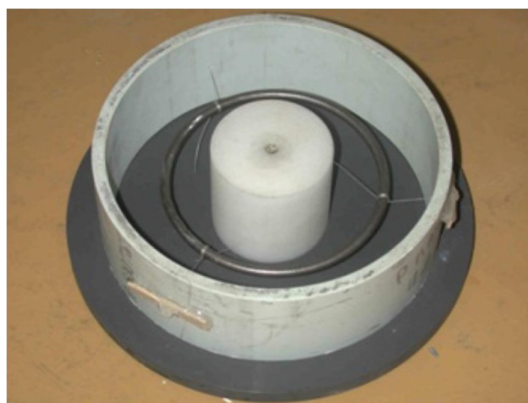


Figure 66 : Moule destiné à la fabrication des éprouvettes de mortier [26].

Le coulage du mortier est réalisé en deux étapes : le moule est d'abord rempli jusqu'à recouvrement de l'anneau d'armature, puis placé sur une table vibrante durant 15 secondes. Le moule est ensuite rempli en totalité, puis placé à nouveau sur la table vibrante durant 30 secondes. La surface supérieure est ensuite arasée, puis l'échantillon est couvert à l'aide d'un film plastique et mis à durcir à température ambiante durant deux jours. L'échantillon est ensuite démoulé et mis à curer à 100 % d'humidité, à 23°C durant 28 jours. Il est ensuite mis à sécher pendant deux jours, puis la surface supérieure de l'échantillon est polie à l'aide d'un tour industriel et d'une meule diamantée.

Les éprouvettes de mortier sont fissurées à l'aide d'un cœur expansif, un cylindre légèrement conique d'acier serti de 6 pétales d'acier enchâssé dans l'ouverture de l'éprouvette. Une bague de PVC sert de protection entre le cœur expansif et le mortier. Le cœur est ensuite forcé à l'aide d'un étau, ce qui provoque l'expansion des pétales et la fissuration du mortier (Figure 67).



Figure 67 : Système de fissuration des éprouvettes : à gauche, éprouvette seule ; au milieu, les pièces du cœur expansif ; à droite, le cœur expansif assemblé dans l'éprouvette [23].

L'ouverture apparente des fissures est estimée en temps réel à l'aide d'un vidéomicroscope afin d'obtenir l'ouverture souhaitée. Ce système permet d'obtenir des fissures radiales réalistes de

taille contrôlée. On s'intéressera aux fissures d'une largeur comprise entre 150 μm et 500 μm , qui sont trop larges pour être cicatrisées par autocicatrisation naturelle mais trop fines pour l'application d'un mortier de réparation. Cette ouverture correspond aux fissures habituellement traitées par injection de résine époxy à basse pression sans perçage.

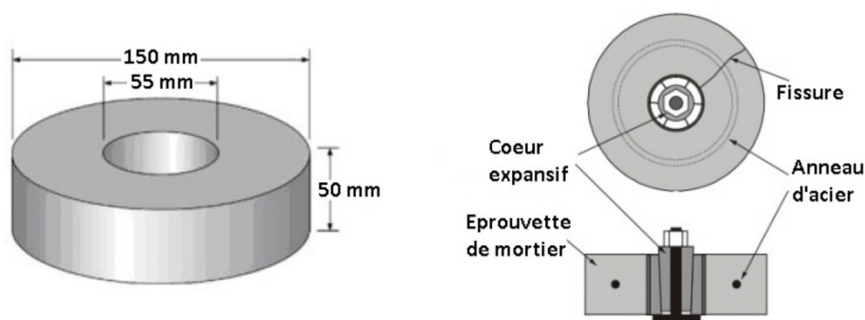


Figure 68 : Représentation schématique d'une éprouvette : à gauche, avant fissuration ; à droite, fissurée avec le cœur expansif [23].

Les éprouvettes fissurées sont mises à curing durant un mois dans une chambre de carbonatation à 23°C, 4 % de CO_2 et 40 % d'humidité, une étape de vieillissement accéléré simulant une exposition prolongée aux intempéries. L'apport en CO_2 permet notamment d'accélérer le processus d'autocicatrisation et ainsi de supprimer ce biais de mesure dans le calcul du taux de biocicatrisation lors des essais. La carbonatation sert aussi à réduire le pH interne des fissures en dessous de 9 et à limiter la diffusion de composés chimiques depuis le mortier vers la fissure. Des éprouvettes sont sacrifiées et soumises à des tests de coloration à la phénolphthaléine, afin de vérifier que le pH est inférieur à 9 dans l'intégralité de la fissure à l'issue de l'étape de carbonatation.

4.2.3. Essais d'injection des suspensions dans des éprouvettes fissurées

Les essais d'injection permettent de déterminer la plage d'utilisation d'une suspension donnée, en définissant les ouvertures à partir desquelles celle-ci est trop fluide ou trop épaisse pour être efficacement utilisée : un milieu trop fluide pour une fissure donnée est défini comme ne nécessitant pas de pression d'injection (imprégnation par capillarité) et se drainant de la fissure après injection. A l'inverse, un milieu trop visqueux pour une fissure donnée se caractérise par un taux de

remplissage inférieur à 80 % malgré une forte pression et une durée d'injection importante. Les essais d'injection sont réalisés sur des fissures d'ouverture comprise entre 100 et 1000 μm . Les essais d'injection sont réalisés sur des suspensions de mélange Welan-Attagel préparées dans le milieu LN. Les suspensions de Methocel ayant un comportement très faiblement rhéofluidifiant, la comparaison des plages d'utilisation de suspensions de Methocel avec celles obtenues pour le mélange Welan-Attagel permet de vérifier si un comportement plus rhéofluidifiant permet d'améliorer l'injection du milieu, c'est-à-dire de faciliter l'injection tout en limitant le drainage post-injection. Une série témoin d'injections est donc réalisée à l'aide de suspensions à 0,4, 0,6, 0,8, 1 et 1,5 % de Methocel dans l'eau distillée. Les suspensions les plus performantes sont celles présentant les plages d'utilisation les plus larges, pouvant être injectées efficacement dans une plus grande variété de fissures.

La technique d'injection utilisée au cours de ce projet s'inspire du procédé d'injection sans perçage de résines époxy à faible viscosité dans les bétons fissurés. Le milieu d'injection est injecté à basse pression à l'aide d'une seringue, par le biais d'un sabot d'injection fixé sur la fissure, dans des éprouvettes fissurées et carbonatées. Un injecteur adapté aux éprouvettes utilisées a été conçu et réalisé pour ce projet : il est composé de deux pièces en aluminium identiques s'emboîtant sur les faces supérieure et inférieure de l'éprouvette, munies d'un port d'injection permettant d'y ajuster une seringue. L'ensemble est maintenu sur la fissure par une pince-étau, et 10 mL de milieu sont injectés manuellement à l'aide d'une seringue de 20 mL, pour un temps d'injection moyen de 10 minutes environ (Figure 69).

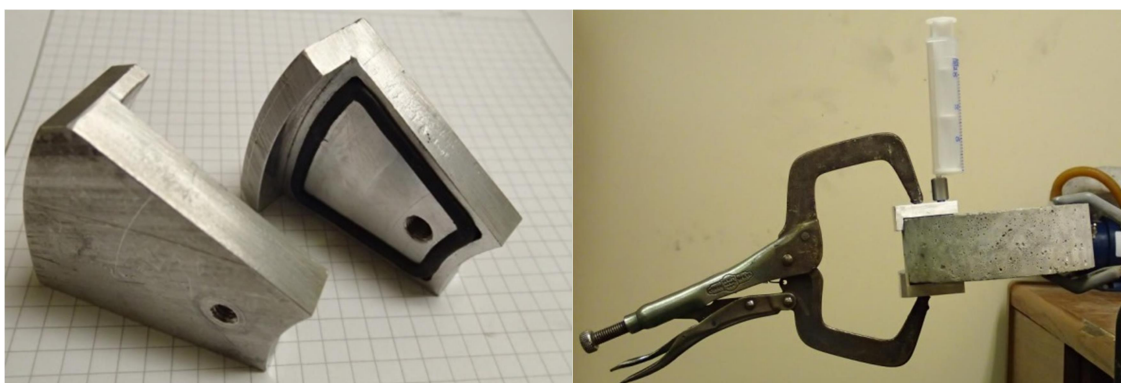


Figure 69 : A gauche – pièces de l'injecteur. A droite – système d'injection installé sur une éprouvette de mortier.

Une bande d'adhésif en aluminium a été appliquée sur la surface de la fissure non couverte par l'injecteur, afin de canaliser le fluide et d'empêcher les fuites latérales lors de l'injection (Figure 70). De l'adhésif a été utilisé, dans la mesure où il ne biaise pas les résultats de perméabilité à l'air des fissures et est neutre vis-à-vis des bactéries, deux conditions indispensables pour la bonne conduite des essais d'injection et de biocicatrisation. Toutefois, dans l'optique du développement d'un procédé de réparation respectueux de l'environnement, il convient d'envisager des techniques alternatives pour préparer les fissures à l'injection. Il est possible de remplacer les adhésifs actuellement utilisés par des colles biosourcées, ou « bio-colles », qui sont des adhésifs biosourcés et biodégradables ayant des propriétés mécaniques proches des adhésifs de synthèse actuels, actuellement surtout employés en médecine [186]. Ils sont pour la plupart sensibles à l'humidité et aux contaminations biologiques ; ces faiblesses peuvent cependant devenir des atouts dans le cadre de l'exobiocicatrisation :

- Riches en matière organique, ils facilitent l'activité bactérienne en constituant une source de nutriments.
- Perméables à l'eau et aux gaz, ils permettent leur renouvellement dans la fissure.
- Biodégradables, ils se dégradent après emploi sans nécessiter d'intervention.

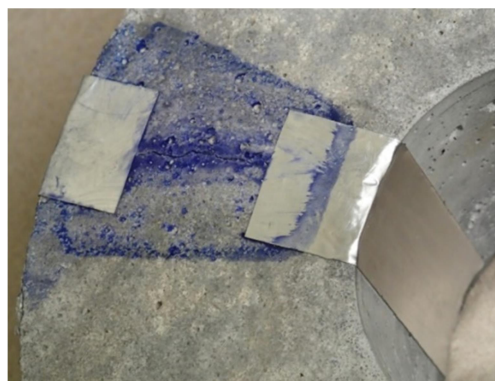


Figure 70: Fissure colmatée par un adhésif aluminium, après injection d'une suspension colorée.

Pour déterminer l'efficacité de l'injection, le milieu a été coloré à l'aide de bleu de méthylène, un colorant non toxique couramment utilisé comme indicateur rédox ou comme colorant alimentaire. Toutefois, ce colorant ne sera pas utilisé au cours des essais de biocicatrisation, puisqu'il s'agit d'un photosensibilisant : exposé à une lumière à 660 nm, le bleu de méthylène produit en effet des radicaux libres pouvant tuer les bactéries [187], [188]. Les suspensions colorées contiennent 1 g/L de bleu de méthylène, ajouté depuis une solution concentrée à 40 g/L. Pour la mesure du taux de remplissage, l'éprouvette est séchée pendant 48 h à l'air libre après l'injection, puis sciée afin d'isoler la zone de la fissure, qui est ensuite séparée en deux pour observer l'intérieur (Figure 71). La paroi de

la fissure est photographiée et l'image binarisée pour faire apparaître en noir la surface colorée, et en blanc la surface non colorée. Le taux de remplissage correspond au pourcentage de pixels noirs par rapport aux pixels totaux.

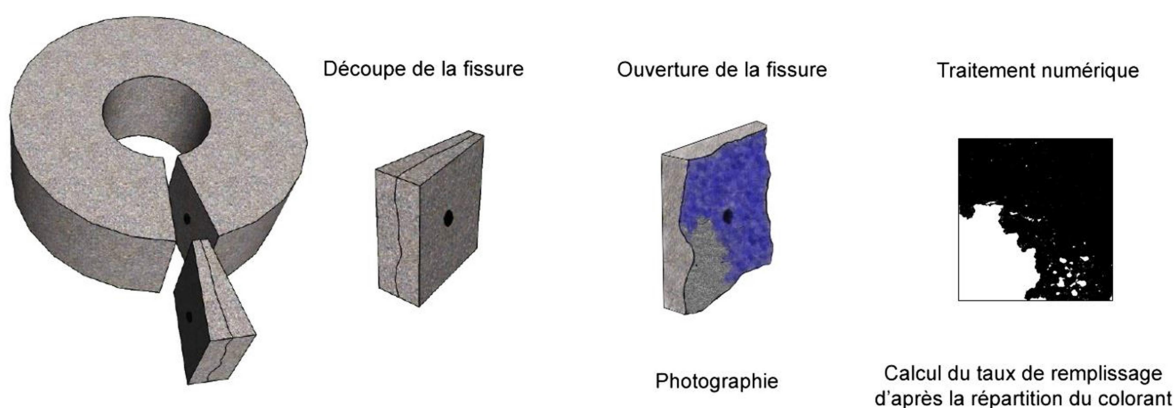


Figure 71: Découpe, ouverture et traitement numérique des fissures ayant subi une injection avec colorant.

Nous avons aussi estimé la vitesse d'évaporation du milieu, l'ajout d'additifs rhéologiques pouvant diminuer la vitesse d'évaporation du milieu et favoriser le maintien de l'activité bactérienne sur une plus longue période. Ce facteur étant difficile à mesurer au sein des fissures, l'évaporation de la suspension WA36 et du milieu LNG sont mesurés par pesée dans des récipients laissés à l'air libre. Pour mesurer la vitesse d'évaporation, 10 g de suspension sont ajoutés dans des béchers de 100 mL (diamètre intérieur 45mm), stockés sur une étagère à 21°C +/-1°C, 30 % HR +/- 10%, située à l'abri des courants d'air, et pesés à intervalles réguliers. Huit réplicats sont réalisés. Ces mesures ne peuvent rendre compte des phénomènes d'évaporation et d'absorption de l'eau dans les fissures mais fournissent une indication sur l'existence d'un atout potentiel de l'épaississement du milieu.

4.2.4. Etude de la microstructure du dépôt d'injection dans la fissure

L'observation au MEB des fissures est réalisée sur les surfaces brutes et sur les sections polies. Après injection, l'éprouvette est séchée à température ambiante durant 48 h. La fissure sèche est enveloppée d'adhésif tissé, ce qui protège l'intérieur de la fissure des projections d'eau et des vibrations provoquées par le sciage. La fissure est ensuite isolée du reste de l'éprouvette par découpe à environ 5 mm de part et d'autre de la fissure à l'aide d'une scie circulaire (Figure 72, 1). Ce morceau

est ensuite scié horizontalement (plan de découpe n°2), et le demi-bloc fissuré (a1 et a2) est imprégné de résine époxy (Araldite 2020) à 200 mbar. Le demi-bloc imprégné est enfin coupé en deux parties (blocs a1 et a2). Un de ces deux morceaux est sélectionné pour l'observation de la section polie de la fissure : la surface du plan de découpe n°3 est polie à une finesse de 1 μm à l'aide de disques abrasifs (grains 120, 600, 1200, 2000 et 4000) et de poudres diamantées de granulométrie décroissante (9, 6, 3 et 1 μm). Le polissage est réalisé à l'eau jusqu'au grain 1200, puis les polissages plus fins sont réalisés à l'aide de lubrifiant DP-Brown (Struers). Le reste de la fissure, non imprégné de résine (blocs b1 et b2), est ouvert en deux pour séparer les deux faces de la fissure, puis un des morceaux obtenus est brisé avec précaution de manière à obtenir un petit bloc montrant une surface interne de la fissure. Cette surface est conservée à l'abri de l'humidité pour être observée directement au MEB. L'imagerie en électrons secondaires est utilisée pour l'observation des surfaces brutes, tandis que les sections polies sont observées par imagerie en électrons rétrodiffusés. Les sections polies comme les surfaces brutes sont métallisées à l'aide d'un filament de carbone avant d'être observées au MEB.

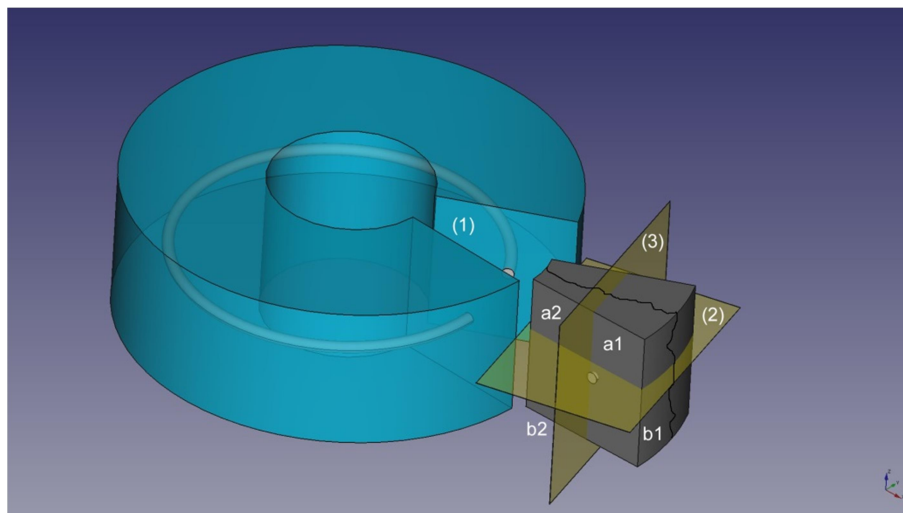


Figure 72: Schéma de découpe d'une éprouvette fissurée pour observation au MEB.

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Caractérisation rhéologique des suspensions testées

Afin de simplifier la description des essais présentés au cours de ce chapitre, les suspensions de mélange Welan-Attagel seront par la suite désignées par l'identifiant WA, suivi d'un indicatif désignant les concentrations respectives en Welan et en Attagel de la suspension étudiée. Par exemple, la suspension WA36 contient 0,3 % de Welan et 6 % d'Attagel.

Nous avons dans un premier temps identifié les limites des concentrations à étudier en employant la matrice de Hadamard présentée précédemment. Les quatre suspensions préparées ont ainsi des concentrations en Welan égales à 0,2 et 0,4 % et en Attagel égales à 4 et 8 %. Des observations empiriques sont réalisées, afin de déterminer si elles sont utilisables pour une injection dans des fissures de 150 à 500 μm . Les observations empiriques réalisées sont présentées dans le Tableau 14, ainsi que les conclusions qui peuvent être faites à partir de ces résultats. On peut conclure de cet essai que la concentration en Welan doit être supérieure à 0,2 % pour assurer une viscosité suffisante au mélange mais inférieure à 0,4 % pour ne pas obtenir une suspension trop épaisse. La concentration en Attagel doit quant à elle être supérieure à 4 % pour donner à la suspension un caractère thixotropique prononcé, mais inférieure à 8 % car une trop forte concentration semble provoquer un phénomène de ségrégation des phases.

Tableau 14 : Observations réalisées sur les suspensions WA préparées d'après la matrice de Hadamard.

	0,2 % Welan	0,4 % Welan	
4 % Attagel	Trop fluide. Faible caractère thixotropique.	Viscosité suffisante. Faible caractère thixotropique.	Manque d'Attagel : faible thixotropie, faible viscosité.
8 % Attagel	Bonne viscosité. Légère tendance à la ségrégation.	Trop épaisse. Légère tendance à la ségrégation.	Excès d'Attagel : Ségrégation observable.
	Manque de Welan : Viscosité faible sauf en excès d'Attagel.	Bonne teneur en Welan : Viscosité adaptable via l'Attagel.	

Dans les limites imposées par la matrice de Hadamard, nous avons généré un plan d'expérience composite à deux facteurs et trois variables pour déterminer les concentrations des suspensions à caractériser. La Figure 73 représente les rhéogrammes de ces suspensions, auxquels

sont ajoutés ceux des suspensions de la matrice de Hadamard et des suspensions WA34 et WA38. Du fait de la bonne répétabilité des mesures, les écart-types (inférieurs à 2 %) sont trop faibles pour être observables sur les rhéogrammes.

En accord avec les mesures de rhéologie réalisées au cours de la sélection des épaississants utilisés, les rhéogrammes obtenus montrent que, pour chacune des suspensions étudiées, la pente de la courbe obtenue décroît fortement lorsque le taux de cisaillement augmente, ce qui correspond à une perte de viscosité de la suspension lors de son agitation (Figure 73). Toutes les suspensions étudiées ont donc un fort comportement rhéofluidifiant, et la viscosité des suspensions étudiées augmente avec la concentration en Welan ou en Attagel. Les suspensions ne semblent pas présenter de modifications de comportement ou d'apparence notables après plusieurs jours, à l'exception de WA 28 qui présente une légère ségrégation des phases après un repos d'une journée.

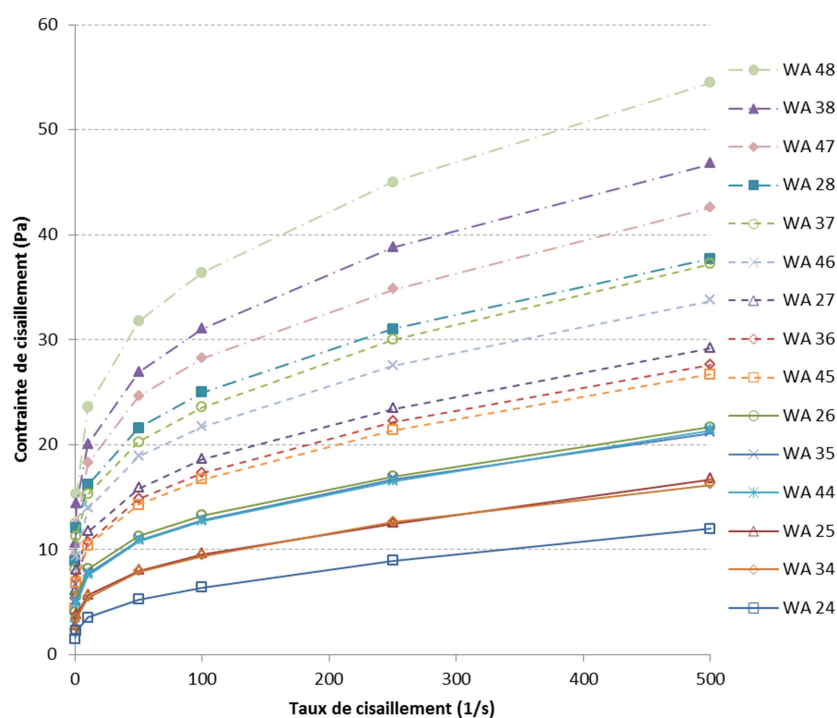


Figure 73 : Rhéogrammes des mélanges WA caractérisés.

La caractérisation au rhéomètre de ces suspensions nous permet de produire un graphique de surface de réponse de la viscosité en fonction des concentrations des deux épaississants (Figure 74). A faible ($0,1 \text{ s}^{-1}$), moyen (100 s^{-1}) et fort (500 s^{-1}) cisaillement, la viscosité augmente proportionnellement à la concentration en Attagel et en Welan et la surface de réponse évolue peu malgré la forte diminution de viscosité induite par l'agitation.

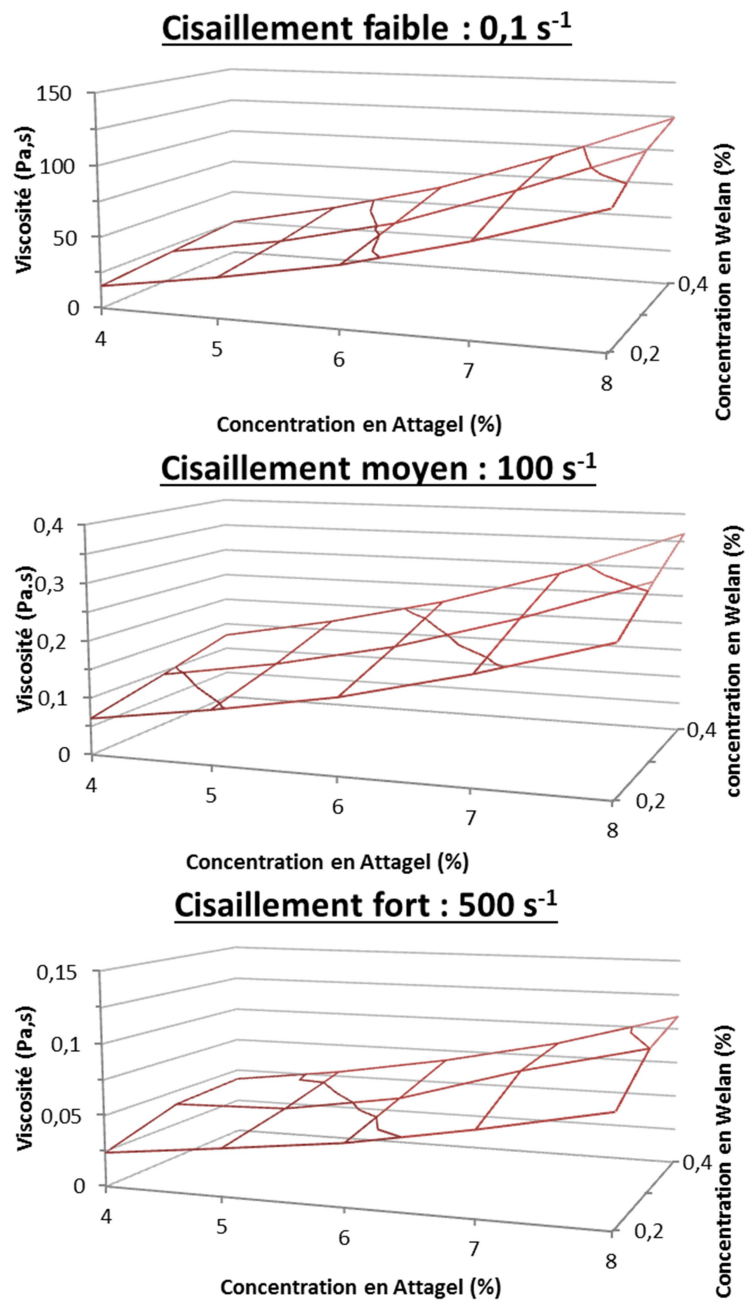


Figure 74 : Surface de réponse des suspensions en fonction des concentrations en Attagel et en Welan aux taux de cisaillement de $0,1$, 100 et 500 s^{-1} .

Les suspensions obtenues sont toutes des fluides rhéofluidifiants, dont les propriétés correspondent au modèle d'Ostwald ($R^2 > 0,997$). Le modèle d'Ostwald, présenté en section 3.3.1, permet de caractériser numériquement un fluide rhéofluidifiant par rapport à deux indices ou coefficients n et k représentant respectivement le caractère rhéofluidifiant et la viscosité intrinsèque du fluide. Le coefficient n , ou indice d'écoulement, est égal à 1 pour des fluides Newtoniens et est compris entre 0 et 1 pour les fluides rhéofluidifiants, un coefficient n faible correspond donc à un comportement rhéofluidifiant élevé. Le coefficient k , ou indice de consistance, est égal à la viscosité du fluide à 1 s^{-1} .

La Figure 75 représente les différentes suspensions testées par rapport à ces coefficients, et le Tableau 15 résume les caractéristiques des suspensions étudiées ainsi que leur adéquation au modèle d'Ostwald. Cette représentation permet de discriminer les effets des deux épaississants sur le comportement rhéologique de la suspension :

- La concentration en Welan a un impact faible sur n , mais plus fort sur k . A de fortes concentrations en Attagel, l'ajout de Welan augmente k uniquement et ne modifie donc pas le caractère rhéofluidifiant de la suspension. Le Welan contribue donc surtout à épaissir la suspension.
- La concentration en Attagel a un effet notable sur les deux indices, augmentant la viscosité (augmentation de la valeur de k) et le caractère rhéofluidifiant (diminution de la valeur de n). Cette observation est corroborée par la chute de viscosité apparente lors de l'agitation (Figure 76). En effet, l'agitation d'une suspension Welan-Attagel à un taux de cisaillement de 500 s^{-1} (par rapport à un taux de cisaillement de $0,1 \text{ s}^{-1}$) permet de diviser sa viscosité par 650 environ pour les suspensions à 4 % d'Attagel, indépendamment de la teneur en Welan. Cette chute de viscosité augmente de manière linéaire avec la concentration en Attagel, pour atteindre un facteur d'environ 1150 à 8 % d'Attagel.

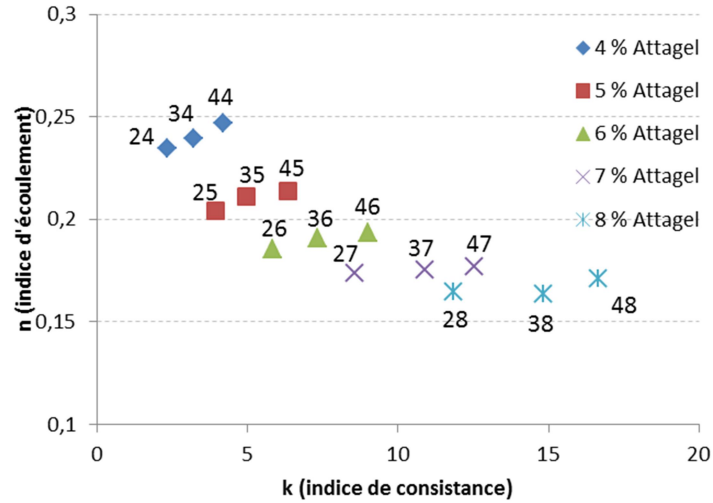


Figure 75 : Propriétés des différentes suspensions suivant la loi d'Ostwald, désignées par leurs identifiants respectifs.

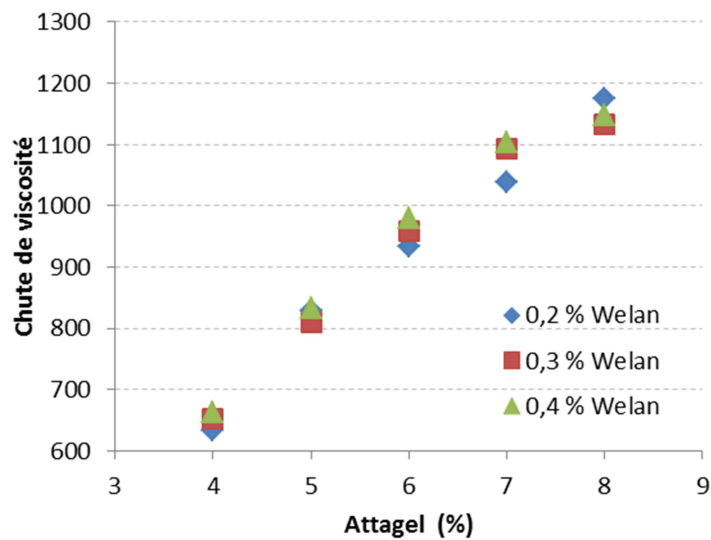


Figure 76 : Chute de viscosité apparente entre $0.1 s^{-1}$ et $500s^{-1}$ en fonction de la teneur en Welan et en Attagel des suspensions.

L'effet de l'Attagel semble être différent en fonction de sa concentration dans la suspension. En effet, la courbe de décroissance de l'indice d'écoulement (n) en fonction de la concentration en Attagel ne suit pas une progression linéaire : on constate qu'en augmentant la concentration en Attagel de 7 à 8 %, l'indice d'écoulement diminue de 0,01 en moyenne et k augmente de 4 en moyenne, tandis qu'une augmentation de la concentration en Attagel de 4 à 5 % permet de faire

diminuer n de 0,03 et augmenter k de 1 à 2. Quand la concentration en Attagel est supérieure à 7 %, l'impact de la concentration en Attagel sur n devient donc faible, tandis que l'impact sur k augmente. A partir de 7 % en Attagel, il serait alors nécessaire d'augmenter fortement la concentration en Attagel pour augmenter le caractère rhéofluidifiant de la suspension. Or, des suspensions très concentrées en Attagel seraient plus difficiles à préparer, plus coûteuses et instables, il n'est donc pas intéressant de préparer des suspensions de Welan-Attagel contenant 8 % d'Attagel ou plus.

Dans l'optique de la formulation d'une suspension d'injection, on cherche à obtenir des suspensions présentant le caractère rhéofluidifiant le plus important possible, donc présentant l'indice n le plus faible possible. L'augmentation de la concentration en Attagel permettant de diminuer n , on emploiera une quantité maximale d'Attagel. Or, au-delà de 7 % d'Attagel, celui-ci n'a presque aucun impact sur n et les suspensions préparées ont une tendance à la ségrégation. Cette caractérisation permet donc de sélectionner les suspensions contenant 6 ou 7 % d'Attagel pour réaliser la formulation du milieu d'injection. La concentration en Welan ayant surtout un impact sur la viscosité de la suspension et influençant peu son caractère rhéofluidifiant, celle-ci peut être ajustée pour adapter la viscosité de la suspension en fonction de l'ouverture des fissures à traiter.

Tableau 15 : Caractéristiques rhéologiques des suspensions de Welan-Attagel selon la loi d'Ostwald.

Echantillon	k	n	R ²
WA24	2,33	0,235	0,997
WA25	3,93	0,204	0,998
WA26	5,82	0,185	0,998
WA27	8,57	0,173	0,998
WA28	11,85	0,164	0,999
WA34	3,22	0,239	0,999
WA35	4,94	0,211	0,999
WA36	7,31	0,191	0,998
WA37	10,90	0,175	0,999
WA38	14,82	0,164	0,999
WA44	4,18	0,247	0,999
WA45	6,34	0,214	0,999
WA46	8,99	0,194	0,999
WA47	12,54	0,177	0,999
WA48	16,67	0,171	0,999

L'examen détaillé des rhéogrammes obtenus (Figure 77) nous permet d'observer, pour toutes les suspensions, un phénomène de thixotropie à court terme qui se traduit par un temps d'environ 15 secondes à chaque changement de taux de cisaillement pour que la viscosité s'équilibre. Ce

phénomène donne lieu à un rhéogramme en « dents de scie » moins lisible et biaisant la détermination de l'équation de la courbe selon le modèle d'Ostwald. Dans un souci de clarté, seuls les résultats de la suspension WA36 ont été présentés (Figure 77). Pour représenter les rhéogrammes des suspensions et déterminer leurs caractéristiques, nous ne prendrons donc en compte que le dernier point de chaque palier, afin d'éviter ce biais. Ce comportement ne doit pas pour autant être ignoré puisqu'il peut avoir un impact sur l'utilisation pratique du mélange WA. D'une part, il impose une contrainte d'utilisation à travers le temps d'agitation nécessaire pour baisser la viscosité. Il constitue d'autre part un atout à travers le délai disponible après agitation avant que la viscosité ne remonte.

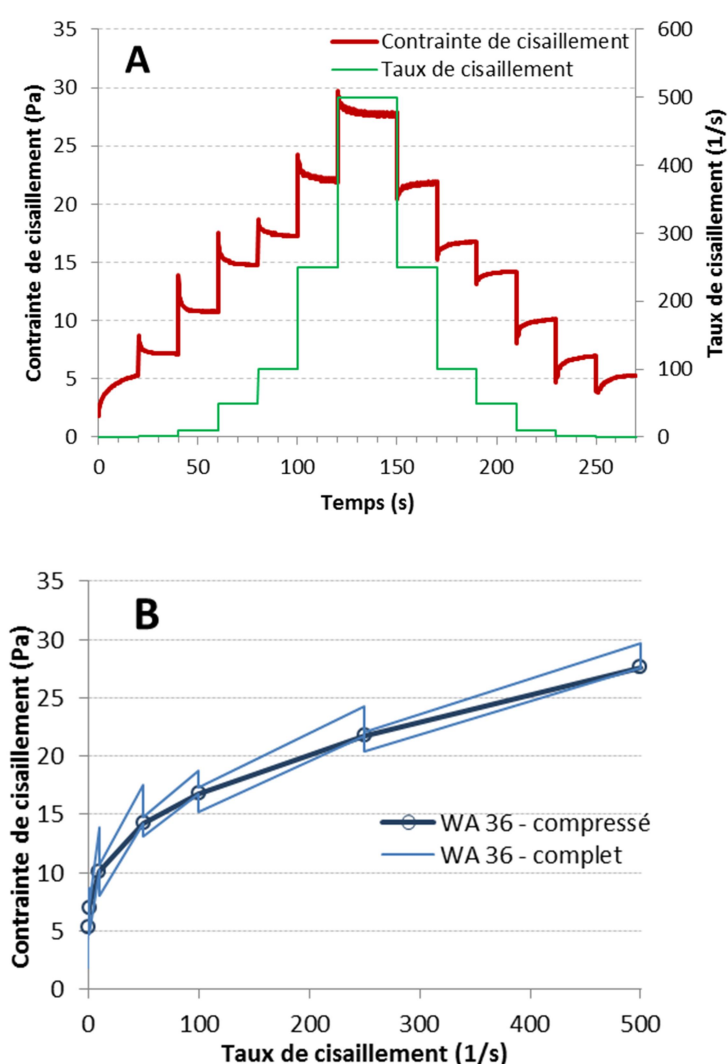


Figure 77: A– Taux et contrainte de cisaillement d'une suspension WA 36 en fonction du temps. B – Contrainte de cisaillement de WA 36 en fonction du taux de cisaillement, complet ou limité au dernier point de chaque palier.

Ce phénomène correspond au temps nécessaire pour que le réseau d'aiguilles d'argile formé par l'Attigel dispersé dans la suspension soit déstructuré lors de l'agitation, puis pour qu'il se réassemble au repos. Ce réseau est formé par les interactions électrostatiques liant les particules entre elles [155], c'est pourquoi il se reforme sans perte de propriétés lors des phases de repos : il est possible de modifier à volonté la viscosité de la suspension par agitation ou repos sans que ses propriétés ne soient altérées.

En plus d'une thixotropie à court terme, les suspensions présentent une thixotropie à long terme s'étalant sur plusieurs heures et se traduisant par une prise en gel des suspensions les plus épaisses, observée lors des essais de sélection des épaississants. Le caractère thixotropique du mélange WA est étudié à travers une mesure de sa viscosité complexe sur une période de repos de 10 minutes suivant une forte déstructuration du fluide. Pour des raisons de clarté, seule la suspension WA36 est présentée (Figure 78). Le rhéogramme de thixotropie de la suspension WA36 montre qu'il y a un regain progressif de viscosité de la suspension au repos après une période d'agitation à un taux de cisaillement de 500 s^{-1} . Le regain de viscosité est d'abord rapide puis de plus en plus lent, et semble se poursuivre après la fin du temps de mesure.

Cette observation est cohérente avec les propriétés connues des épaississants employés : la thixotropie est une caractéristique phare de l'Attigel, qui est de fait responsable du comportement thixotropique des mélanges WA. L'Attigel est en effet un produit commercial principalement employé comme agent de charge dans les peintures, le comportement thixotropique apporté par l'Attigel est destiné à en faciliter l'emploi en assurant une viscosité faible durant toute la phase d'étalement, suivie par un regain de viscosité empêchant la formation de coulures [184].

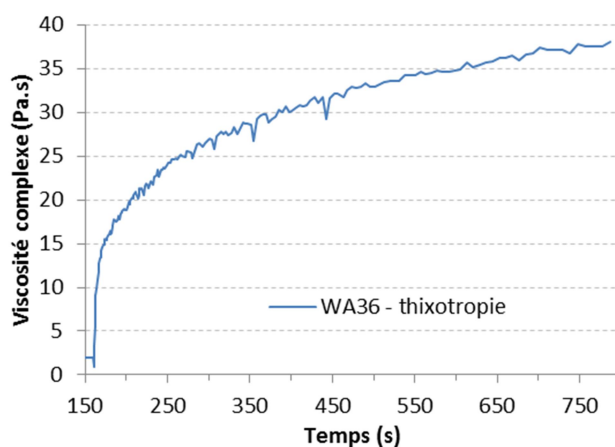


Figure 78 : Mesure de la thixotropie de la suspension WA36 pendant 10 minutes.

Des tests de gélification montrent que le regain de viscosité au repos se poursuit pendant une période de plusieurs heures : les suspensions telles que WA 36 et celles étant plus épaisses peuvent former un gel au bout de six heures de repos, ce gel peut être déstructuré par agitation et se reformer sans altération des propriétés. Ce gel est plus solide et plus rapide à se former pour les suspensions les plus épaisses. Sur des périodes de plusieurs heures, les suspensions sont donc des fluides de Herschel-Bulkley, c'est-à-dire des fluides rhéofluidifiants à seuil. Il s'agit de propriétés typiques de suspensions colloïdales, dont la viscosité est générée par un entrelacement de particules jusqu'à former un pseudo-gel. Etant donné le temps nécessaire pour que la gélification des suspensions ait lieu, le processus d'injection est trop court pour permettre ce phénomène avant la fin de l'injection. La rétention du milieu dans les fissures larges après injection repose donc largement sur leur thixotropie durant les minutes suivant l'injection.

Selon la largeur de la fissure, la concentration des suspensions en Attagel peut donc être adaptée pour favoriser un regain rapide de viscosité après injection et une rétention maximale dans les fissures larges. Cette thixotropie à long terme est intéressante pour la mise en œuvre de la biocicatrisation, puisqu'elle retarde la prise en masse du fluide lors de l'injection dans une fissure, facilitant une injection complète dans des fissures profondes où le taux de cisaillement peut devenir faible.

4.3.2. Injection du mélange Welan-Attagel

Des essais d'injection ont été réalisés pour déterminer quelles sont les concentrations idéales en Welan et en Attagel pour traiter des fissures de 150 à 500 μm (Tableau 16). Conformément aux conclusions faites lors de la caractérisation rhéologique du mélange, nous avons réalisé ces essais sur des suspensions contenant 6 ou 7 % d'Attagel, pour des teneurs en Welan de 0,2, 0,3 ou 0,4 %.

Ces suspensions permettent d'obtenir des taux de remplissage supérieurs à 80 % dans des fissures d'ouverture supérieure à 120 μm , la largeur minimale augmentant jusqu'à 210 μm pour la suspension la plus épaisse. Toutes les suspensions étudiées présentent une forte résistance au drainage, ce qui leur permet d'être utilisables sur des fissures allant jusqu'à 800 μm d'ouverture même pour les plus fluides.

En revanche, pour les essais d'injection réalisés avec des suspensions de Methocel (Tableau 17), la plage d'utilisation (intervalle entre largeur minimale et largeur maximale) des suspensions de Methocel n'excède jamais 150 μm , ce qui en fait des suspensions très peu polyvalentes comparées au mélange WA. Il faut toutefois noter que des fissures d'ouverture identiques peuvent ne pas présenter la même résistance à l'écoulement puisque leur tortuosité peut différer. Les plages d'utilisation estimées ont donc une imprécision pouvant atteindre plusieurs dizaines de micromètres.

Tableau 16 : Plages d'utilisation approximatives des suspensions de Welan-Attagel réalisées.

Welan (%)	Attagel (%)	Viscosité à 100 s^{-1} (Pa.s)	Largeur minimale (μm)	Largeur maximale (μm)
0,2	6	0,15	120	800
0,2	7	0,220	140	>800
0,3	6	0,219	140	>800
0,3	7	0,289	160	>800
0,4	6	0,296	200	>1000
0,4	7	0,376	210	>1000

Tableau 17 : Plages d'utilisation des suspensions de Methocel d'après les essais réalisés.

Methocel (%)	Viscosité à 100 s^{-1} (Pa)	Largeur minimale (μm)	Largeur maximale (μm)
0,4	0,022	<100	<150
0,6	0,072	150	250
0,8	0,133	200	280
1	0,234	200	300
1,5	0,821	250	400

Malgré l'incertitude de mesure constatée, on observe que le mélange WA est largement plus performant que le Methocel. En effet, les différents mélanges WA testés ont une plage d'utilisation de minimum 700 μm , tandis que les suspensions de Methocel ont une plage d'utilisation de 150 μm environ. Ces mélanges ont en effet un caractère plus rhéofluidifiant que les suspensions de Methocel et sont thixotropiques, ce qui leur confère une polyvalence élevée en les rendant particulièrement résistantes au drainage tout en restant facilement injectables. La suspension WA 36, contenant 0.3 % de Welan et 6 % d'Attagel, semble offrir le meilleur compromis entre facilité d'injection et résistance au drainage, et sera donc choisie pour les essais de croissance bactérienne en milieu épaissi et les essais de biocicatrisation.

Pour les fissures n'ayant pas été totalement remplies, on constate que la « zone morte » non atteinte par le milieu d'injection est en général située dans le quartier intérieur bas de l'éprouvette (Figure 79). Il arrive aussi que cette « zone morte » se situe autour de l'anneau d'armature, car celui-ci maintient les deux faces collées. Ces zones correspondent en effet aux endroits où la fissure est la plus étroite.

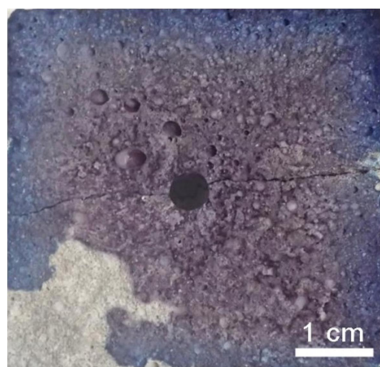


Figure 79: Coloration d'une fissure d'ouverture 157 μm après injection d'une suspension de Methocel à 0,6 %.

Le côté droit correspond à la face extérieure de l'éprouvette.

Des fissures ayant été injectées avec le mélange WA avec et sans colorant sont ouvertes après deux jours de séchage à l'air libre, afin d'observer l'intérieur des fissures suite à l'injection de milieu épaissi. La suspension injectée forme sur les parois intérieures une croûte sèche et solide d'épaisseur variable (Figure 80 et Figure 81). Des crêtes de dépôt sont irrégulièrement réparties à la surface des fissures, et sont d'autant plus importantes que la fissure est large. Du fait de sa rétractation lors du séchage, la suspension solidifiée n'occupe pas toute l'épaisseur ni toute la surface des fissures, et en est partiellement décollée. Mis à part cet écaillage, elle présente une bonne adhérence au matériau et ne peut être grattée à l'ongle. Le dépôt d'injection semble adhérer à l'ensemble de la surface du mortier, il semble toutefois légèrement moins bien adhérer aux grains de sable, une différence probablement due à la faible rugosité de ceux-ci.



Figure 80 : Observation d'une fissure après injection et séchage de la suspension WA36 colorée au bleu de méthylène.

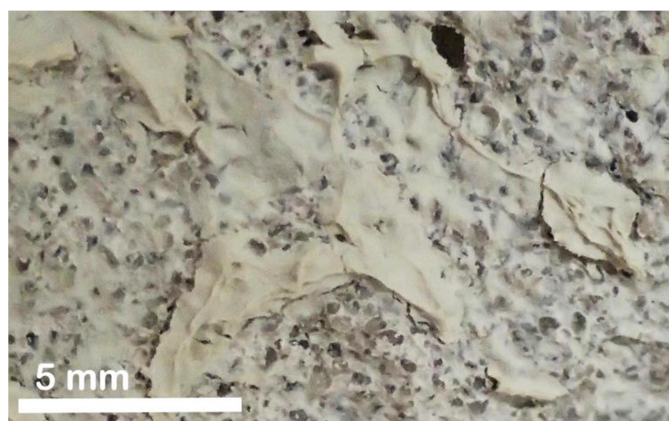


Figure 81 : Observation d'une fissure après injection et séchage de la suspension WA36 sans colorant.

4.3.2.1. Comportement au séchage du mélange Welan-AttageI

La vitesse de séchage du fluide injecté dans la fissure après l'injection est un facteur décisif pour les bactéries, et réduire cette vitesse permettrait d'améliorer la disponibilité de l'eau pour les bactéries et favoriser le processus de biocicatrisation. En raison de la difficulté à mesurer l'évaporation dans les fissures (faible volume injecté, variabilité du volume et de la surface de la fissure, impact de l'absorption d'eau par le mortier), ces mesures sont réalisées dans des récipients laissés à l'air libre et permettent seulement de vérifier si la vitesse d'évaporation est plus faible dans la suspension épaissie WA36 (ou milieu épaissi) que dans le milieu non épaissi.

La vitesse de séchage est identique dans les milieux LN non épaissi et épaissi avec le mélange Welan-Attagel : la présence d'épaississants ne ralentit pas l'évaporation du milieu (Figure 82). La quantité totale d'eau évaporée depuis le milieu épaissi est légèrement inférieure puisque la teneur en eau du milieu est réduite par la présence des épaississants. La suspension complètement séchée forme une croûte rigide et légèrement rétractée comprenant de petits amas de cristaux, vraisemblablement de lactate et de nitrate de calcium, étant donné que le Nutrient Broth ne cristallise pas au séchage. Le milieu non épaissi complètement séché donne lieu à la formation d'une croûte de cristaux précipités. Lorsque de l'eau est à nouveau ajoutée, la croûte devient souple sans se dissoudre ou se décomposer, formant un film similaire à une peau. En l'absence d'épaississants, les nutriments présents dans le milieu précipitent sous forme d'amas de cristaux solubles.

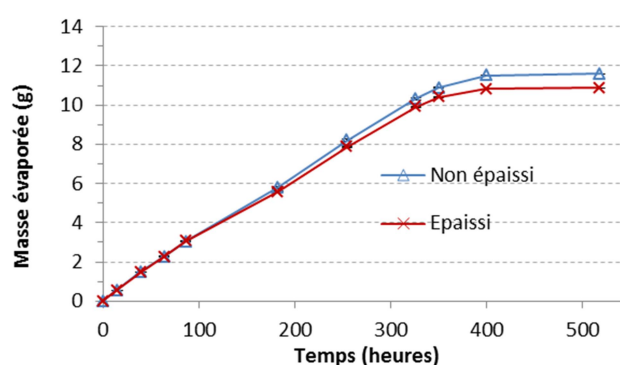


Figure 82: Vitesses d'évaporation du milieu non épaissi et d'une suspension de WA36 (0,3 % de Welan et 6 % d'Attagel).

Le milieu épaissi forme au séchage un film solide qui, malgré un écaillage partiel, a une bonne adhérence au mortier et peut contribuer à la réduction de perméabilité à l'air des fissures. Le film formé par le milieu épaissi n'est pas soluble et se comporte comme un film souple une fois imbibé d'eau, il peut donc présenter une résistance importante au lessivage, un atout important pour le maintien des bactéries dans la fissure et pour la tenue à long terme du dépôt d'injection dans la fissure. En effet, les bactéries étant mêlées aux épaississants dans le milieu lors de l'injection, elles peuvent être immobilisées au sein du film lors de son séchage. L'immobilisation bactérienne au sein d'une fissure favoriserait la biocicatrisation en protégeant les bactéries contre le lessivage, soit par des précipitations, soit par les réinjections de milieu nutritif stérile. De plus, ce vecteur participe directement à la réduction de perméabilité des fissures par le biais du dépôt formé dans la fissure.

4.3.3. Etude de la microstructure du dépôt d'injection

Après injection de milieu épaissi, les fissures sont séchées à l'air libre puis observées au MEB, afin d'observer avec précision la répartition physique du dépôt au sein de celles-ci, c'est-à-dire déterminer si le film est uniforme ou irrégulier, s'il est cohésif ou non avec le matériau. Cette première observation réalisée à l'échelle millimétrique est suivie par des observations à plus fort grossissement visant à caractériser la nature et la microstructure du dépôt.

L'observation d'une section de fissure au microscope électronique à balayage (MEB) est présentée sur la Figure 83. On observe en effet que le dépôt sec forme un film très mince sur les parois de la fissure, d'épaisseur comprise entre 5 et 50 μm , alors que la fissure était initialement complètement remplie. Occupant initialement tout le volume interne de la fissure, le milieu épaissi se rétracte donc au fur et à mesure que la suspension sèche pour se déposer sur les parois des fissures. Il est détaché de la matrice cimentaire en plusieurs points, ce qui correspond à l'écaillage observé à l'œil nu. Cet écaillage peut cependant avoir été amplifié par les vibrations auxquelles l'échantillon a été soumis lors de la découpe de l'éprouvette de mortier.

On observe en plus de nombreuses accumulations de dépôt formant des crêtes au sein de la fissure, reliant parfois les deux faces de celle-ci en formant un pont (Figure 83, zones entourées). L'observation de la surface interne des fissures permet de constater que ces crêtes forment un réseau entre elles (Figure 84). Cette structure peut avoir un impact doublement positif sur l'activité bactérienne : le dépôt constitue un support d'immobilisation bactérienne, et la présence de crêtes augmente la surface d'échange entre les bactéries et le volume intérieur de la fissure.

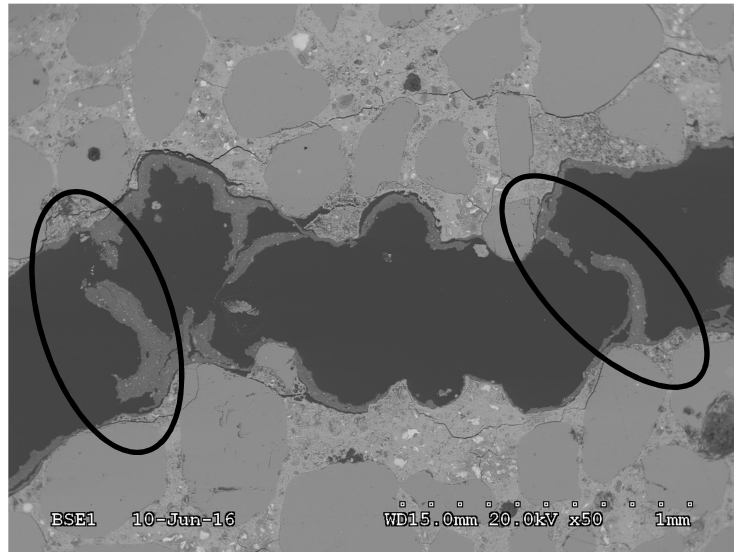


Figure 83 : Observation au MEB d'une section polie d'une fissure après injection de la suspension WA36.

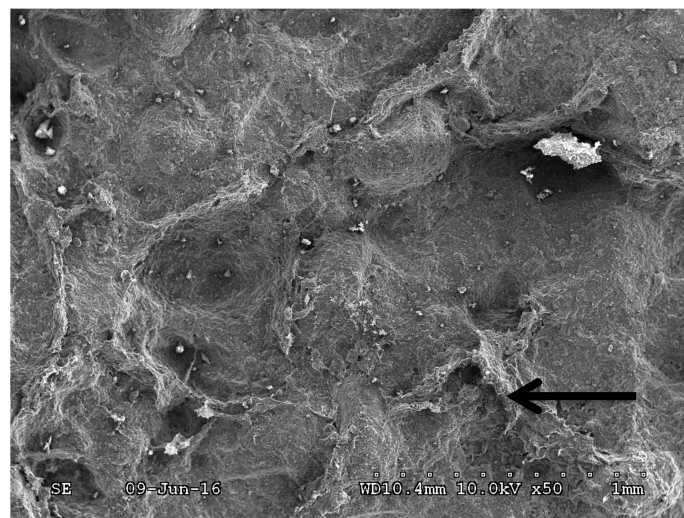


Figure 84 : Observation au MEB du dépôt d'injection sur la surface interne d'une fissure après injection de la suspension WA36. Flèche : crête de dépôt d'injection.

Il y a donc un dépôt très irrégulier de solide dans les fissures, dont l'épaisseur est en moyenne largement inférieure à 50 μm . Les crêtes jointives observées forment néanmoins des barrières physiques au sein de la fissure, qui peuvent drastiquement améliorer le colmatage. La finesse de ces crêtes peut néanmoins les rendre fragiles vis-à-vis de fortes pressions d'eau ou de mouvements de la fissure, la réduction de perméabilité à l'air obtenue peut donc être supprimée si ces crêtes ne résistent pas aux contraintes auxquelles sont soumises les fissures.

La composition chimique du dépôt d'injection formé suite à l'injection de la suspension WA36 a été étudiée à l'aide d'observations au MEB couplées à une analyse à dispersion d'énergie (EDS) des zones observées. Les analyses montrent que la couche de dépôt est essentiellement constituée d'Attigel (Magnésium Aluminium Silicate). Les valeurs présentées dans le Tableau 18 montrent quelques différences entre la composition théorique de l'Attigel [184] et celle du dépôt d'injection, calculée d'après les mesures réalisées par EDS. En effet, la teneur en silice dans l'échantillon est supérieure de plus de 10 % à la teneur en silice de l'Attigel, tandis que les concentrations en autres minéraux sont assez proches des valeurs théoriques, avec des écarts de l'ordre de 1 %.

Toutefois, ces différences sont peu importantes compte-tenu des écart-types de mesure, notamment dans le cas de la silice pour laquelle l'écart-type est de 9 %. Ces différences peuvent être dues à la présence de particules dans le dépôt, qui peuvent interférer avec les mesures. Ces particules sont de très petite taille (10 µm en moyenne) et dispersées dans le dépôt d'argile (Figure 85). Celles-ci sont de nature variée :

- Dolomite ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), minéral entrant dans la composition de l'Attigel (< 5 %) [172] ;
- Précipités riches en carbone et en calcium, probablement du lactate de calcium. Leur taille souvent inférieure à 10 µm et la variabilité de leur composition rend toutefois leur identification difficile ;
- Quartz (SiO_2), provenant du sable composant le mortier mais aussi présent dans l'Attigel (5 à 7 %) ;
- Carbonate de calcium (CaCO_3) pouvant provenir de l'Attigel (contenant 5 % de calcite) ou de produits d'autocicatrisation emportés lors de l'injection ;
- Éléments constitutifs de la matrice cimentaire (calcium, silicium et oxygène), issus des débris de mortier dispersés dans la fissure et mélangés au milieu lors de l'injection.

Tableau 18: Composition du dépôt d'injection de la suspension WA36 mesurée par EDS et composition théorique de la poudre d'Attigel [184].

Composé	Teneur calculée d'après analyse EDS (% massique)	Teneur officielle du produit commercial (% massique)
SiO_2	77,7 (+/- 9,0)	65,2
Al_2O_3	11,7 (+/- 1,2)	12,7
MgO	11,1 (+/- 0,9)	12,3
Fe_2O_3	4,5 (+/- 1,0)	3,5

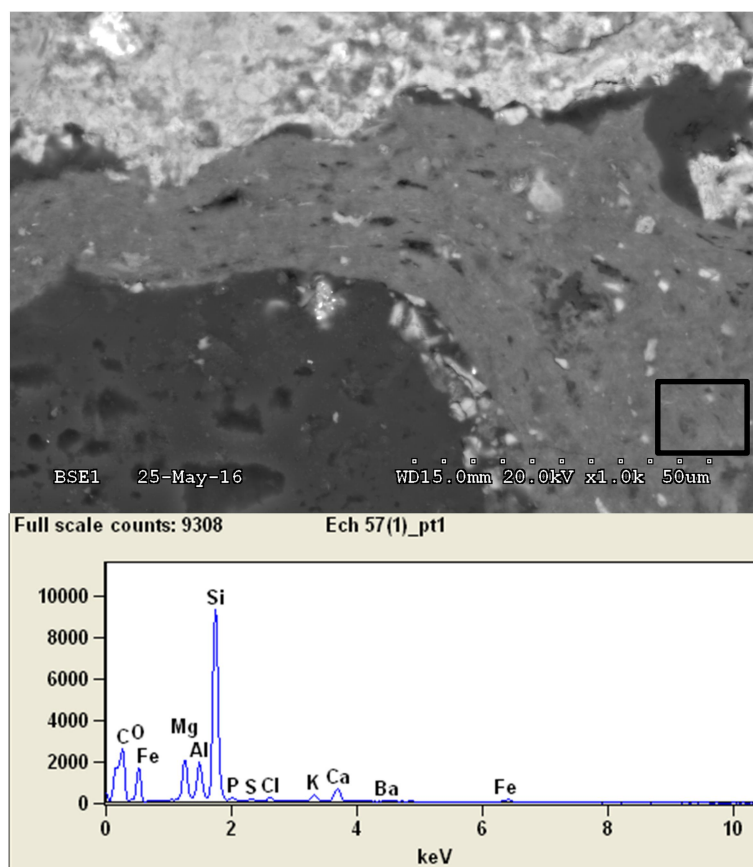


Figure 85 : Section polie d'une fissure observée au MEB après injection et séchage de la suspension WA36, et analyse EDS de la zone encadrée en noir (dépôt d'injection).

La surface du dépôt, observée au MEB, a l'apparence d'un tapis d'aiguilles entrelacées de 1 à 5 µm de longueur, contenant des particules diverses et des précipités ainsi que des rhomboèdres de dolomite (Figure 86). Le tapis d'aiguilles observé est un entrelacs de plaquettes d'argile, dont l'apparence correspond avec les micrographies disponibles dans la littérature [155], [189]. Ce tapis d'argile recouvre l'essentiel de la surface intérieure du mortier, à part dans les quelques zones ayant subi un écaillage du dépôt.

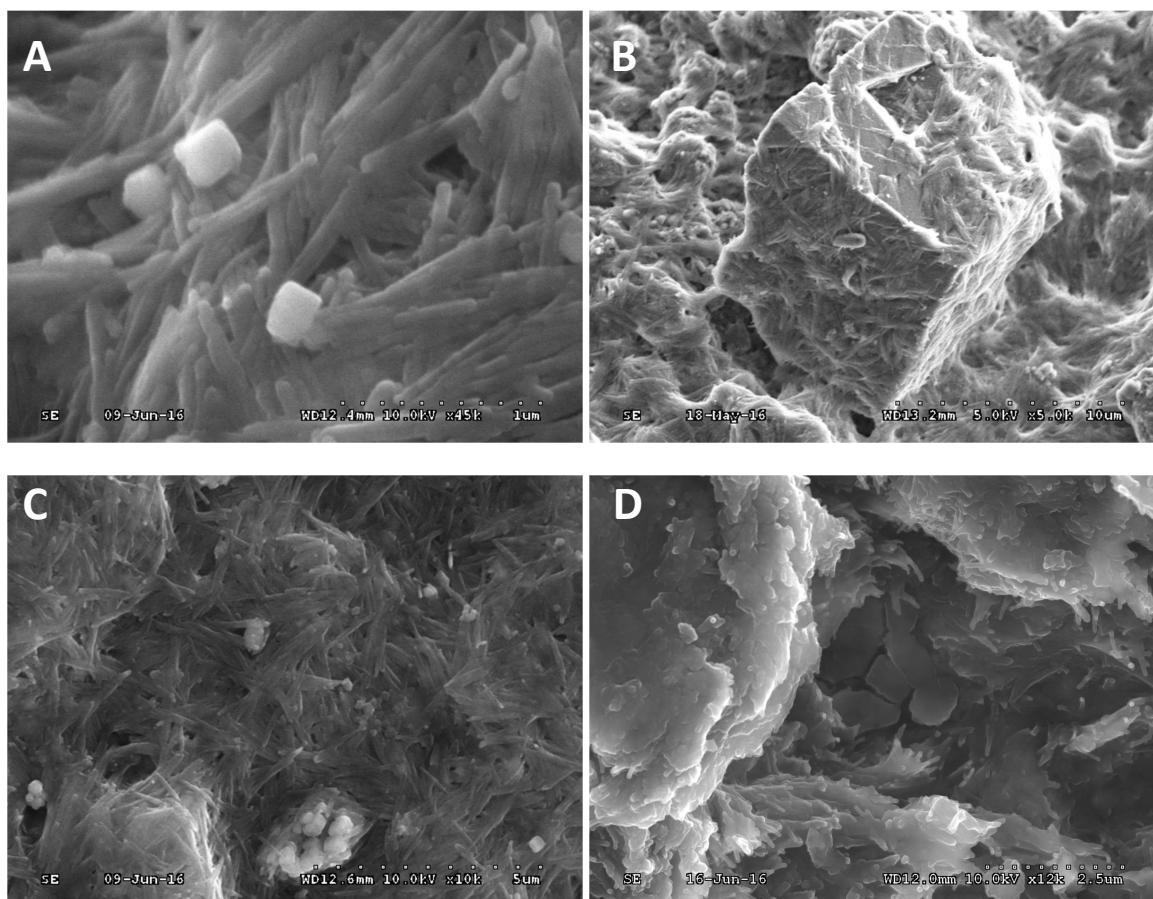


Figure 86 : Observations au MEB du dépôt d'injection après injection de la suspension WA36. A - tapis d'argiles et cristaux non identifiés ; B - cristal de dolomite partiellement recouvert d'argiles ; C et D – surfaces couvertes avec particules non identifiées.

A la surface du mortier, il est possible d'observer par endroits une couche de moins de 20 μm d'épaisseur formée de cristaux prismatiques développés depuis la surface de la matrice cimentaire vers la lumière de la fissure (Figure 87). La composition atomique de ces cristaux d'après l'analyse EDS est de 29 % (+/- 2 %) de calcium et 69 % (+/- 4 %) d'oxygène, ce qui est proche de la composition du carbonate de calcium étant donné que le carbone n'est pas inclus dans la mesure. Il s'agit donc de carbonate de calcium résultant de l'autocicatrisation de la fissure, formé durant la carbonatation des fissures, puis recouvert lors de l'injection de milieu épaissi. Cette couche d'autocicatrisation est en général dissimulée sous la couche de dépôt mais peut être révélée en cas d'écaillage de celle-ci, comme le montre la Figure 88.

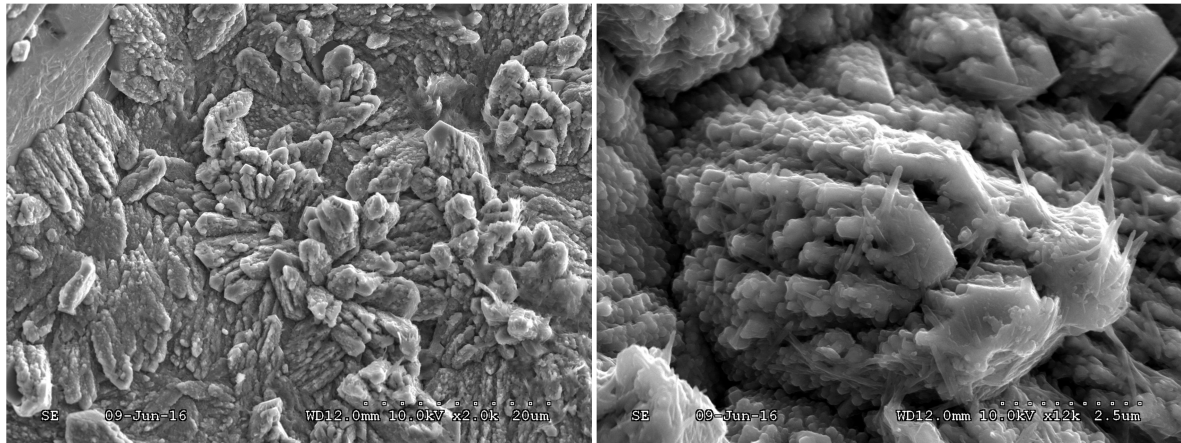


Figure 87 : Observations au MEB de la couche d'autocicatrisation du mortier à différents grossissements.

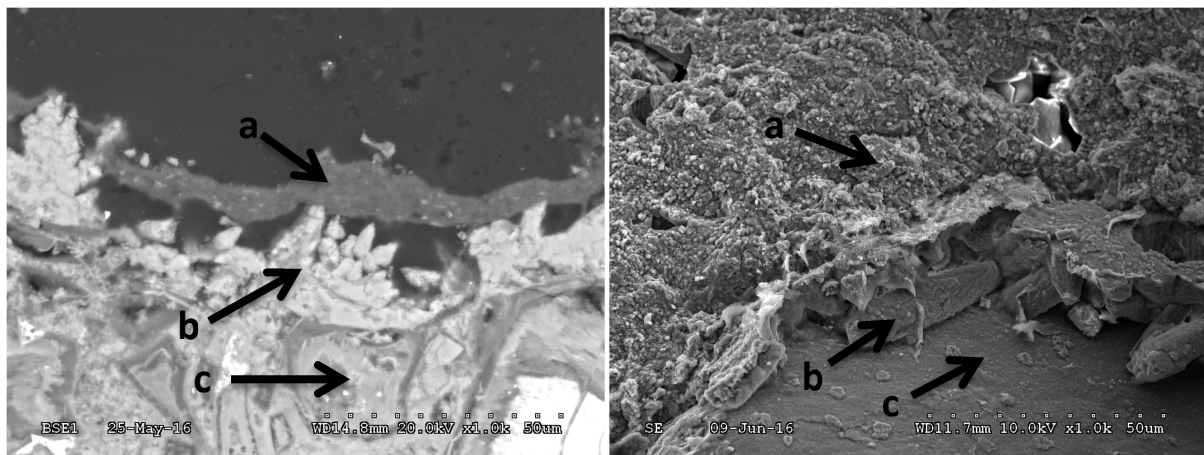


Figure 88 : Observations au MEB de la couche d'autocicatrisation (b) et du dépôt d'injection (a) recouvrant partiellement la matrice cimentaire (c).

Ces observations permettent de caractériser précisément la structure ainsi que la nature du dépôt formé dans les fissures suite à l'injection de la suspension WA36, qui sera nommée par la suite « milieu épaissi ». En séchant, le milieu épaissi déposé dans la fissure s'amincit très fortement pour former un film mince à la surface du mortier, présentant une bonne adhérence générale au matériau malgré un écaillage partiel.

Malgré sa finesse, ce dépôt a potentiellement un effet important sur la perméabilité de la fissure puisqu'il forme un réseau de crêtes agissant comme barrières à l'écoulement, formant parfois même des ponts entre les deux faces de la fissure. Essentiellement constitué d'argiles, le dépôt forme à la surface du matériau un tapis dense emprisonnant à la fois les autres composants du milieu et les débris divers déjà présents dans la fissure. Ces observations confirment celles réalisées à l'échelle

macroscopique : le milieu épaissi constitue un moyen efficace pour introduire et immobiliser les bactéries au sein des fissures, et peut contribuer significativement à la réduction de la perméabilité à l'air en complément du processus de biocicatrisation.

4.4. Conclusion

Les essais réalisés au cours de ce chapitre ont permis de mettre au point une suspension épaissie stable, homogène, rhéofluidifiante et thixotropique dans le milieu appauvri, en utilisant du Welan et de l'Attigel dispersés dans la solution.

Dans un premier temps, la caractérisation rhéologique du mélange WA a été réalisée à plusieurs concentrations de Welan et d'Attigel, afin d'étudier l'impact de la concentration en épaississants sur les propriétés rhéologiques des suspensions obtenues, c'est-à-dire sur leur caractère rhéofluidifiant et thixotrope. Pour ce faire, chacune des suspensions étudiées a été caractérisée selon le modèle d'Ostwald. Les suspensions WA les plus rhéofluidifiantes ont par la suite été soumises à des essais d'injection réalisés sur des fissures réelles. L'adéquation d'une suspension à une fissure d'ouverture donnée a été déterminée *via* la possibilité de remplir complètement cette fissure sans qu'il n'y ait de drainage post-injection observable. Dans un second temps, l'intérieur des fissures a été observé au MEB après les injections, de manière à étudier la structure et la composition du dépôt argileux formé à l'intérieur des fissures.

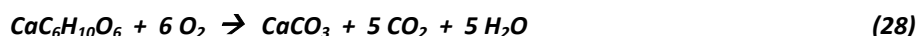
Ces essais ont permis de sélectionner la suspension WA36 pour les essais de croissance bactérienne et de biocicatrisation. Celle-ci présente en effet les caractéristiques rhéologiques optimales pour l'injection dans des fissures d'ouverture comprise entre 150 et 500 μm . Le chapitre suivant consiste à caractériser et à optimiser la production de carbonate de calcium dans ce milieu par la souche bactérienne *B. pseudofirmus*.

CHAPITRE 5.

Etude de la croissance bactérienne en milieu épaissi

5.1. Introduction

Nous utilisons pour ce projet la bactérie Gram positive *Bacillus pseudofirmus*, une bactérie aérobie, hétérotrophe et alcalinophile (capable de se développer jusqu'à pH 11), et dont la capacité à produire d'importantes quantités de carbonate de calcium a été vérifiée par Ducasse-Lapeyrousse (2014) [5]. Les bactéries sont cultivées dans un milieu nutritif à base d'extrait de levure auquel est ajouté du lactate de calcium et du nitrate de calcium, qui ont le rôle de précurseurs : ils constituent les sources de calcium nécessaires à la bioproduction de carbonate de calcium. Le lactate de calcium, bien que plus coûteux que l'urée plus communément utilisée, présente l'avantage de fournir une source de calcium en plus d'une source de carbone, et de ne pas provoquer la formation d'ions ammonium qui est délétère pour le béton à fortes concentrations [7], [131]. La réaction de dégradation aérobie du lactate de calcium par les bactéries donne lieu à la formation d'une mole de carbonate de calcium par mole de lactate de calcium consommé, libérant également cinq moles d'eau et cinq moles de CO₂ [190] :



Cette partie a pour objectif d'évaluer la capacité de *B. pseudofirmus* à produire du carbonate de calcium dans les conditions de biocicatrisation appliquées au cours de ce projet, plus précisément dans une fissure soumise à un climat tempéré (20°C), au sein d'un milieu épaissi à l'aide des épaississants sélectionnés dans le chapitre précédent (Welan et d'Attagel). Bien que la capacité de *B. pseudofirmus* à produire du carbonate de calcium à partir du lactate de calcium et du nitrate de calcium ait été vérifiée à 30°C dans un milieu non épaissi, il est nécessaire d'évaluer l'impact de la température et de l'ajout d'épaississants sur la croissance de cette souche bactérienne et sur sa capacité à produire du carbonate de calcium.

Les essais sont systématiquement réalisés à la fois dans le milieu non épaissi et dans le milieu épaissi, afin de déterminer l'effet de l'épaississement du milieu dans toutes les conditions de culture étudiées, de vérifier dans quelles conditions cet épaississement a un effet positif, neutre ou négatif sur la biominéralisation bactérienne. Dans un premier temps, des essais de croissance préliminaires sont menés dans les conditions de croissance appliquées au cours des travaux de Ducasse-Lapeyrousse

(2014) [5] pour vérifier les caractéristiques de croissance de *B. pseudofirmus*. Les résultats obtenus sont ensuite utilisés comme références pour estimer l'impact du changement de température et des différentes modifications de protocole appliquées sur le processus de biominéralisation, afin d'améliorer la vitesse de croissance bactérienne et la production de carbonate de calcium.

Le suivi des essais de croissance bactérienne implique notamment la mesure de la production de carbonate de calcium, mais aussi l'observation de la morphologie bactérienne, le suivi du pH, de la concentration en lactate et/ou en gluconate et de la taille de la population bactérienne, permettant d'identifier les facteurs régissant la production de carbonate de calcium. Les modifications apportées au protocole expérimental au fil des essais permettront à la fin de ce chapitre d'aboutir à une technique de culture optimisée, qui sera par la suite utilisée pour réaliser les essais de biocicatrisation.

5.2. Matériel et méthodes

5.2.1. Mise en œuvre des essais de croissance bactérienne

Au cours des différents essais réalisés, les conditions d'inoculation et de croissance sont modifiées, dans le but de maximiser la fiabilité et l'efficacité des essais. Ces modifications sont précisées en introduction des essais correspondants. Tous les essais suivent cependant une trame commune en trois étapes successives : cryotube, préculture et croissance.

Les souches bactériennes (*Bacillus pseudofirmus*, souche DMS 2516, DSMZ) sont stockées dans des cryotubes contenant 1 mL de préculture bactérienne en phase exponentielle de croissance et 0,5 mL de glycérol, stockés à -85°C. Un cryotube de 1,5 mL est utilisé pour inoculer un erlenmeyer de 100 mL de préculture. Dans un deuxième temps, les précultures sont cultivées à 30°C (+/- 1°C) sur table d'agitation à 150 rpm dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture. Cette préculture est par la suite employée comme inoculum pour l'essai de croissance lui-même. L'essai de croissance est réalisé dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture. Les cultures sont réalisées en triplicat à 20°C +/- 2°C durant 35 jours, et agitées à 150 rpm sur un plateau rotatif. 3 mL de culture sont régulièrement prélevés pour réaliser le suivi de la culture via la mesure du pH (sonde Sensitix 41, WTW), le dosage du lactate et le comptage de la population bactérienne. En fin d'essai, la fraction solide est récupérée, afin de déterminer la quantité de carbonate de calcium produite.

Le dosage du lactate est réalisé par chromatographie ionique (ICS-3000, Dionex). Cette technique permet d'isoler et de quantifier des molécules dotées d'une charge électrique. L'appareil est muni d'une colonne (AS11HC, Dionex), et l'élution est réalisée par un mélange à 80 % d'eau ultrapure et 20 % de soude à 5 mmol/L, à un débit de 10 mL/min, pour un volume d'injection de 20 µL. Les échantillons sont au préalable filtrés à 0,22 µm à l'aide d'un filtre pour seringue en acétate de cellulose, puis dilués 2000 fois, afin de ne pas saturer la colonne. Les concentrations en lactate (temps de rétention 5,1 minutes) et en gluconate (temps de rétention 4,6 minutes) sont étalonnées à l'aide d'une courbe en 5 points, aux concentrations égales à 5, 10, 20, 40 et 80 mg/L. Pour les essais de croissance en milieu LN, les solutions étalons ne contiennent que du lactate de calcium, tandis que les étalons contiennent un mélange lactate-gluconate pour les essais en milieu LNG. La quantification du gluconate dans les milieux contenant du gluconate de calcium est toutefois difficile, en raison de la présence de pics parasites sur le chromatogramme (Annexe 1). Par conséquent, la consommation de gluconate ne sera appréciée que qualitativement, par sa présence ou son absence en fin de culture.

Pour réaliser le comptage de la population bactérienne, les cellules sont colorées à l'acridine orange, qui provoque la fluorescence verte de l'ADN présent dans toutes les cellules, et la fluorescence rouge de l'ARN, seulement présent dans les cellules vivantes. Après dilution dans une solution saline, coloration et rinçage, les cellules colorées sont observées sous lumière fluorescente à 490 nm grâce à un microscope à épifluorescence (Leica DMLP). Afin de déterminer la concentration bactérienne, la moyenne des bactéries comptées sur la zone d'observation (de surface 0,0298 mm²) est rapportée à la surface du filtre (226,98 mm²), puis à la quantité de bactéries par mL de suspension en multipliant la concentration de bactéries par le taux de dilution effectué.

Pour déterminer la production de carbonate de calcium en fin de culture, un échantillon de suspension bactérienne est centrifugé à 4000 rpm, à 4°C, pendant 20 minutes (centrifugeuse MF-20, AWEL) dans des tubes Falcon® de 50 mL. Le surnageant est jeté et le culot est dispersé avec 20 mL d'eau ultrapure, puis la suspension est centrifugée à nouveau et l'opération est répétée deux fois pour rincer le culot. Le culot est ensuite séché à 40°C et pesé pour la détermination de la teneur en matière sèche, puis soumis à une analyse thermogravimétrique (Jupiter STA 449 F3, Netzsch) pour le dosage du carbonate de calcium, se dégradant entre 600 et 800°C. L'analyse thermogravimétrique permet d'obtenir des informations sur la composition d'un matériau en lui faisant subir une augmentation progressive de température, couplée à un suivi en temps réel de la masse de l'échantillon. L'évaporation de l'eau, la décomposition de la matière organique et des phases minérales se traduisent par des variations de masse à des plages de température spécifiques. A travers les réactions de dégradation des composés étudiés, les variations de masse mesurées permettent de déterminer

leurs concentrations dans l'échantillon. Cette analyse est réalisée sur les milieux stériles, afin de déduire la quantité de composés initialement présents dans le milieu se dégradant dans la même plage de température que le carbonate de calcium, ceux-ci pouvant générer un biais positif. Entre 600 et 800°C, le milieu non épaissi ne présente pas de perte de masse, mais le milieu épaissi perd 5,3 % de masse (Annexe 2). Ce biais est dû à la présence de carbonate de calcium dans l'Attigel 50 : le milieu épaissi contient donc 7 g/L de carbonate de calcium, cette teneur a été prise en compte et déduite pour la détermination du carbonate de calcium biogénéré en milieu épaissi.

5.2.2. Milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux de culture sont utilisés, leur composition est présentée dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Milieux utilisés pour les essais de croissance bactérienne.

Milieu	Composition	Utilisation
NB	8g/L Nutrient Broth, pH 9.6 (Tampon 0,5M Na ₂ CO ₃ / 1M NaHCO ₃).	Précultures ou cryotubes
NBN	8g/L Nutrient Broth + 12 g/L nitrate de calcium tétrahydraté	
NBN dopé	8g/L Nutrient Broth + 24 g/L nitrate de calcium tétrahydraté	
LN	3g/L Extrait de Levure + 75g/L Lactate de Calcium + 47 g/L nitrate de calcium tétrahydraté	Essais de croissance
LNG	3g/L Extrait de Levure + 75g/L Lactate de Calcium + 47 g/L nitrate de calcium tétrahydraté + 20 g/L gluconate de calcium	
LNW	Milieu LN + 0.3 % Welan + 6 % Attigel 50	
LNGW	Milieu LNG + 0.3 % Welan + 6 % Attigel 50	

Le milieu NB est stérilisé par autoclavage tandis que les milieux contenant du lactate de calcium sont stérilisés par filtration à 0,22 µm. Pour les milieux NBN et NBN dopé, la solution de Nutrient Broth et la solution de nitrate de calcium sont stérilisées séparément par autoclave puis mélangées lors de l'inoculation de la culture. Les épaississants sont autoclavés secs puis dispersés séparément dans le milieu stérile avant d'être mélangés. Du fait de la présence ou non de gluconate de calcium, les milieux LN et LNG ont des potentiels différents pour la production de carbonate de calcium. Les trois sources de calcium, nommées précurseurs dans ce document, sont le lactate de

calcium, le nitrate de calcium et le gluconate de calcium. Pour le lactate et le gluconate de calcium, la dégradation d'une mole de précurseur donne lieu à la formation d'une mole de carbonate de calcium.

Le Tableau 20 détaille le potentiel de production de carbonate de calcium de chacun des milieux utilisés pour les essais de croissance bactérienne ainsi que la contribution de chaque précurseur au potentiel de production de carbonate de calcium.

Tableau 20 : Concentrations et potentiel de production de carbonate de calcium pour chacun des précurseurs et des milieux étudiés.

Milieu	Lactate de Ca tétrahydraté (290,26 g/mol)		Nitrate de Ca tétrahydraté (236,128 g/mol)		Gluconate de Ca monohydraté (448,38 g/mol)		Potentiel de production de CaCO ₃ (100,08 g/mol)	
	g/L	mol/L	g/L	mol/L	g/L	mol/L	mol/L	g/L
LN	75	0,258	47	0,199	0	0	0,457	45,78
LNG	75	0,258	47	0,199	20	0,045	0,502	50,24
Lactate de Ca seul	75	0,258	0	0	0	0	0,258	25,86
Nitrate de Ca seul	0	0	47	0,199	0	0	0,199	19,92
Gluconate de Ca seul	0	0	0	0	20	0,045	0,045	4,46

5.2.3. Optimisation des conditions de culture bactérienne

Dans le but de reproduire les résultats obtenus par Ducasse-Lapeyrosse (2014) [5] et obtenir des valeurs de référence pour la modification de la méthodologie de biocicatrisation, un premier essai est réalisé dans des conditions de culture identiques :

- Inoculation de la préculture depuis un cryotube en milieu NB;
- Préculture à 30°C en milieu NBN jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance (5.10^9 à 1.10^{10} bactéries/mL) ;
- Inoculation de l'essai de croissance à l'aide de 100 µL de préculture pour 100 mL de milieu ;
- Essai de croissance à 30°C, en milieu LN. Cet essai est simultanément conduit en milieu LNW pour observer l'effet de l'épaississement du milieu dans ces conditions.

Nous avons par la suite réalisé plusieurs essais en appliquant des conditions de culture et de préculture différentes, dans le but de maximiser la production de carbonate de calcium et la fiabilité du procédé. Plusieurs possibilités étant en effet envisageables à chaque étape, nous avons donc réalisé des essais en employant des conditions alternatives à chaque étape, et éliminé à chaque itération les conditions offrant les résultats les moins satisfaisants. Les spécificités de mise en œuvre de chaque essai sont présentées en introduction des résultats correspondants. Les modifications apportées au protocole concernent la préparation des cryotubes, la nature de la préculture, l'inoculation de l'essai de croissance et la composition du milieu de culture. Certains essais de croissance ne sont pas inoculés à l'aide d'un aliquote mais d'un concentré de préculture. Dans ce cas, une préculture de 100 mL en fin de phase de croissance bactérienne est centrifugée dans des tubes Falcon de 50 mL à 4000 g durant 20 minutes, à 20°C. Le surnageant est jeté, puis le culot de centrifugation est dispersé dans 100 mL de milieu de culture, dans un erlenmeyer de 250 mL. Tous les essais de croissance comportent 3 erlenmeyers en milieu non épaissi et 3 erlenmeyers en milieu épaissi. L'ensemble des essais de croissance réalisés est résumé dans l'organigramme suivant (Figure 89).

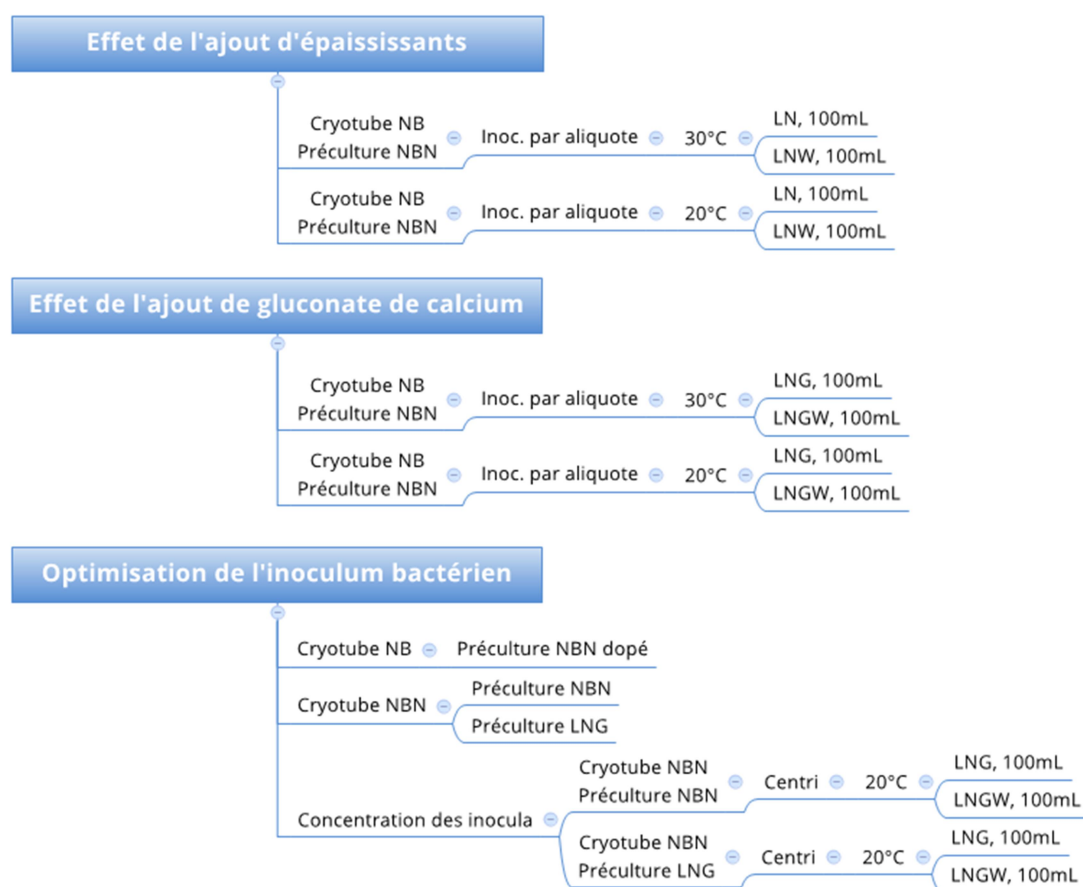


Figure 89 : Organigramme des différents essais de croissance bactérienne réalisés.

5.3. Résultats et interprétation

5.3.1. Effet des épaississants sur la croissance bactérienne

Dans un premier temps, un essai dit « standard » a été réalisé, afin de caractériser la croissance bactérienne et la conversion du lactate de calcium en carbonate de calcium, en employant les conditions de culture mises au point par Ducasse-Lapeyrousse (2014) [5]. Les résultats de cet essai seront comparés à ceux obtenus par Ducasse-Lapeyrousse, afin d'identifier et interpréter les éventuelles différences de résultats pouvant découler du changement d'opérateur, de matériels et de méthodes de mesure entre les deux projets. Ce premier essai servira par la suite de référence pour évaluer l'impact des différentes modifications apportées au protocole.

5.3.1.1. Essais de croissance bactérienne à 30°C

Les bactéries ne sont pas directement inoculées dans le milieu de croissance depuis les cryotubes de stockage, elles subissent d'abord une préculture dans le milieu NBN, milieu nutritif à base de Nutrient Broth enrichi en nitrate de calcium (12 g/L). Cette préculture permet d'acclimater les bactéries aux milieux utilisés pour les essais de croissance, qui contiennent du nitrate de calcium à une concentration importante (47 g/L). En effet, les cultures directement inoculées en milieu LN depuis le milieu NB ne se développent pas, car le nitrate de calcium engendre à cette concentration un stress trop important pour qu'elles se développent [5]. Les bactéries répondent à ce stress en modifiant leur morphologie, phénomène assez répandu mais dont les causes exactes sont encore mal comprises [191]. Au cours des essais réalisés, plusieurs formes ont pu être observées (Figure 90) générant des courbes de croissance différentes (Figure 91). Ce changement de morphologie est très imprévisible et plusieurs réplicats issus d'une même culture, cultivés dans des conditions identiques, peuvent présenter des morphologies différentes, observables seules ou en mélange :

- Cocci (sphères), assemblés en paires ou en tétrades (Figure 90, A). Cette forme est obtenue après une phase de latence de 30 à 40 h durant laquelle il n'y a pas de croissance bactérienne. Le passage à l'état cocci marque le début de la phase de croissance exponentielle. la phase stationnaire est atteinte après 24 h, à environ $5 \cdot 10^9$ bactéries/mL.
- Bacilles allongés, en chaînes (Figure 90, C). Quand cette morphologie est obtenue, il n'y a pas de phase de latence observable, mais la croissance est plus progressive : la phase stationnaire est atteinte en 55 h, pour environ $5 \cdot 10^9$ bactéries/mL. Cette morphologie peut

parfois être observée en mélange avec la forme cocci (Figure 90, B). Au fur et à mesure, les bacilles s'allongent de plus en plus pour donner une quatrième morphologie :

- Filaments, dérivés de l'allongement des bacilles (Figure 90, D). Cette dernière forme, rare, n'est atteinte que pour les cultures âgées et résulte probablement de l'allongement de la forme précédente.

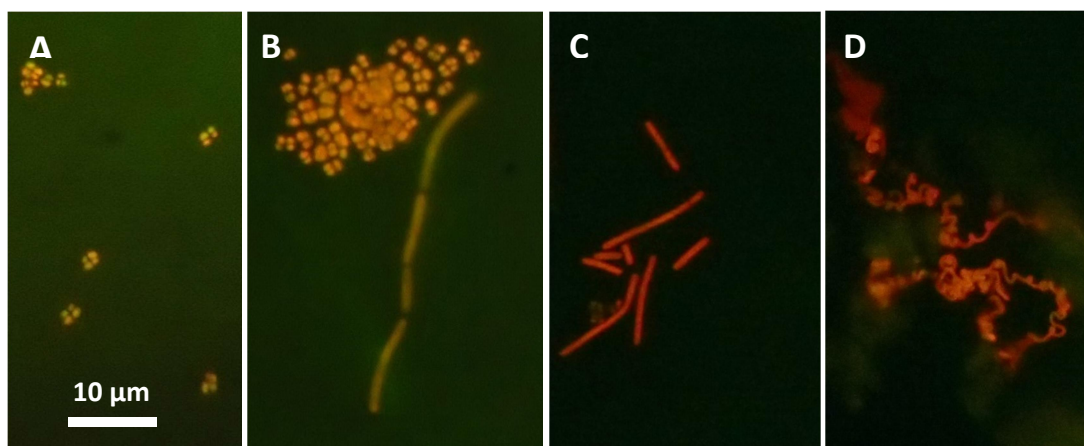


Figure 90: Micrographies de cultures de *B. pseudofirmus* colorées à l'acridine orange.

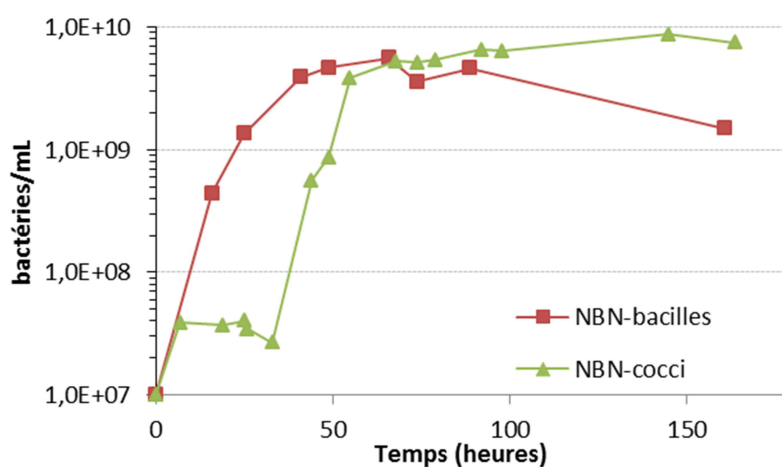


Figure 91 : Cinétique de croissance bactérienne en milieu NBN, selon la morphologie adoptée.

La forme « cocci » est la plus stable et la seule qui ne soit pas réversible. Le passage sous cette morphologie est vraisemblablement déclenché en réponse au stress provoqué par l'ajout de nitrate de calcium. La forme « cocci » étant la seule forme stable, nous n'emploierons les bactéries que sous cette forme-ci pour les essais de biominéralisation, de manière à assurer la répétabilité des résultats.

Pour comparaison, les bactéries se présentent dans le milieu NB sous formes de bâtonnets (bacilles) de 3 à 5 μm de longueur isolés les uns des autres ; il n'y a dans ce cas pas de phase de latence observable et la phase stationnaire est atteinte au bout de 10 h.

Dans les cultures en milieu LN non épaissi, les bactéries se développent sous forme de cocci assemblées en tétrades, et croissent rapidement pour atteindre la phase stationnaire en moins de 6 jours avec une population comprise entre 7.10^9 et 1.10^{10} bactéries/mL restant stable durant toute la durée de l'essai (Figure 92). Le pH augmente rapidement puis se stabilise à environ 7,5 dès le 5^{ème} jour de culture. La consommation de lactate est rapide, et le lactate est entièrement consommé au bout de 18 jours. En fin de culture, 19,6 g/L de matières sèches composée à 82 % de CaCO_3 sont récupérées, correspondant à 16,2 g/L (+/- 1,9 g/L) de carbonate de calcium produits au cours de l'essai.

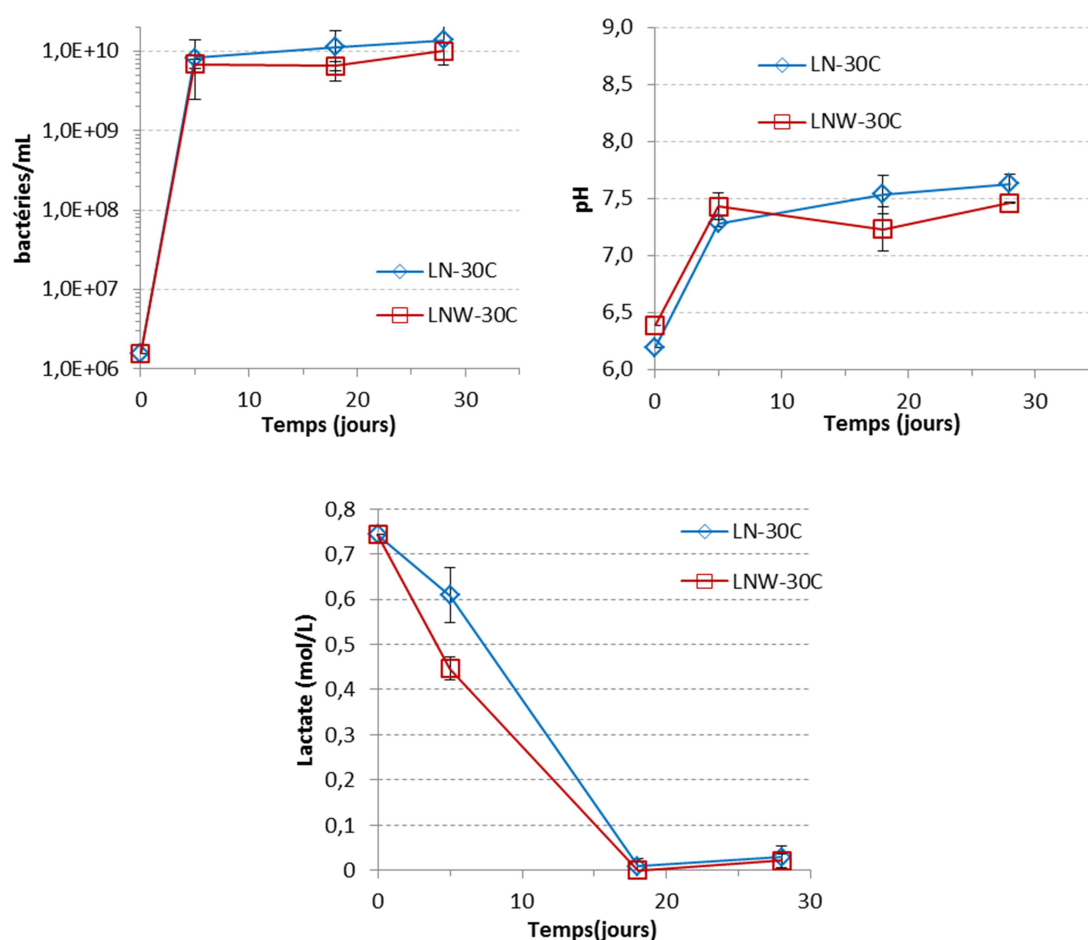


Figure 92 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieux LN et LNW à 30°C.

Tableau 21 : Production de matière sèche et de carbonate de calcium en milieux LN et LNW à 30°C.

Echantillon	LN-1	LN-2	LN-3	Moyenne LN	LNW-1	LNW-2	LNW-3	Moyenne LNW
Matière sèche récupérée (g/L)	17,2	20,8	20,8	19,6 (+/- 2,1)	88,5	93,1	88,4	90,0 (+/- 2,7)
Teneur en CaCO ₃ du résidu sec (%)	82	82	83	82 (+/- 1)	35	36	34	35 (+/- 1)
CaCO ₃ produit (g/L)	14,1	17,1	17,3	16,2 (+/- 1,8)	24,2	26,7	23,0	24,6 (+/- 1,9)

La culture en milieu épaissi présente une cinétique de croissance similaire à celle en milieu non épaissi (Figure 92). Le pH augmente à 7,5 dès le cinquième jour de culture pour osciller autour de 7,4 au lieu d'augmenter progressivement, mais reste globalement proche de celui mesuré en milieu non épaissi. Dans le milieu non épaissi comme dans le milieu épaissi, la consommation de lactate est rapide et il n'y a plus de lactate en solution après 18 jours de culture. Dans le milieu épaissi, 90 g/L (+/- 2,7 g/L) de matières sèches sont récupérées à la fin de l'essai (Tableau 21), composée à 27 % (+/- 1 %) de CaCO₃ biogénéré, il y a donc eu 24,6 g/L (+/- 1,9 g/L) de CaCO₃ produits au cours de l'essai. L'épaississement du milieu s'accompagne donc d'une hausse de 52 % de la production de carbonate de calcium, et par la multiplication par 4,6 de la quantité de matières sèches en fin d'essai. Cette différence résulte à la fois d'une bioproduction de carbonate de calcium accrue en milieu épaissi et de l'apport de composés insolubles supplémentaires dans le milieu de culture, ce qui peut significativement contribuer au colmatage des fissures lors de la mise en œuvre de la biocicatrisation.

Les productions de CaCO₃ en milieu épaissi et en milieu non épaissi correspondent respectivement à 54 % et 36 % du calcium initialement présent dans le milieu. Le devenir du calcium libéré par la consommation du lactate de calcium et non converti en carbonate de calcium est inconnu, il est probable qu'il fasse partie de molécules organiques solubles issues de la dégradation partielle du lactate de calcium. L'observation des cultures au microscope à épifluorescence après coloration à l'acridine orange révèle que les bactéries peuvent se développer dans le milieu épaissi. Les cellules sont emprisonnées dans des amas fibreux mêlant les deux additifs (Figure 93). Cette interaction physique a pu être observée dans toutes les cultures réalisées, avec cependant des variations entre les essais. En effet, on observe dans les cultures épaissies une cohabitation des formes bacille et cocci, et les chaînes de bacilles observées sont souvent en sporulation, ce qui peut se diagnostiquer par l'apparition de l'endospore gonflant une extrémité du bacille. De plus,

l'enchevêtrement des cellules dans le réseau fibreux d'épaississants peut être plus ou moins important. Cette variabilité de morphologies, qui n'est pas observée dans les cultures non épaissies, est probablement due à une hétérogénéité du milieu épaissi. Cette hétérogénéité est due à la forte viscosité du milieu qui réduit l'efficacité de l'agitation ainsi que la diffusion des molécules dans la phase liquide.

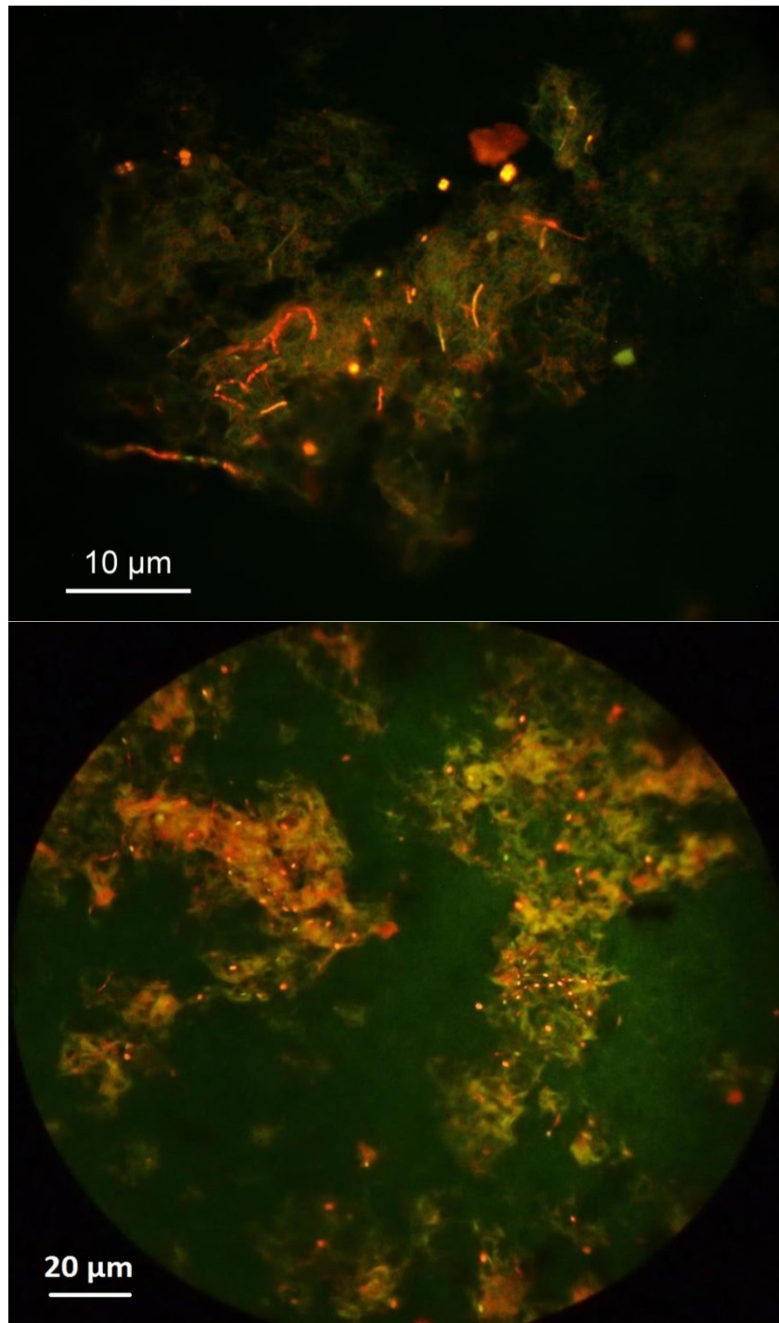


Figure 93: Bactéries (bacilles et tétrades, points jaunes et filaments rouges) dans un amas (en vert) d'épaississants (Welan-Attagel) après 35 jours de culture.

5.3.1.2. Essais de croissance bactérienne à 20°C

Les cultures en milieu LN à 20°C ont une répétabilité médiocre due à une instabilité des morphologies, bien qu'elles aient été systématiquement inoculées depuis des précultures sous forme cocci. Six réplicats ont été réalisés pour cet essai, afin de confirmer cette variabilité avec un échantillon plus large. En milieu LN, la phase stationnaire est atteinte pour tous les échantillons dès le premier prélèvement à 6 jours de culture, avec une population comprise entre 5.10^9 et 1.10^{10} cellules/mL, diminuant progressivement avec le temps jusqu'à atteindre 2.10^9 bactéries/mL au bout de 35 jours (Figure 94). Le changement de température sur la vitesse de croissance n'est donc pas observable, mais semble affecter la population bactérienne sur le plus long terme. Le pH augmente progressivement jusqu'à 7,2, beaucoup plus lentement qu'à 30°C où il atteint 7,5 dès le 5^{ème} jour de culture. La consommation de lactate est progressive et très variable, comprise entre 50 % et 86 % après 35 jours de culture. Trois réplicats sur six ont une production de carbonate de calcium comprise entre 15 et 20 g/L, quantité similaire à celle obtenue à 30°C, mais l'autre moitié des réplicats ne produit que 3 à 5 g/L de carbonate de calcium (Tableau 22). Il y a donc en milieu non épaissi une forte variabilité de la consommation de lactate et de la production de carbonate de calcium à 20°C, dont la cause n'a pas pu être élucidée.

Tableau 22 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieu LN à 20°C.

Echantillon	LN-1	LN-2	LN-3	LN-4	LN-5	LN-6	Moyenne
Matière sèche récupérée (g/L)	5,22	18,90	7,14	18,10	24,19	9,53	13,9 (+/- 7,6)
Teneur en CaCO_3 du résidu sec (%)	59	89	67	90	92	64	77 (+/- 15)
CaCO_3 biogénéré (g/L)	3,1	16,9	4,8	16,2	22,2	6,1	11,6 (+/- 7,9)

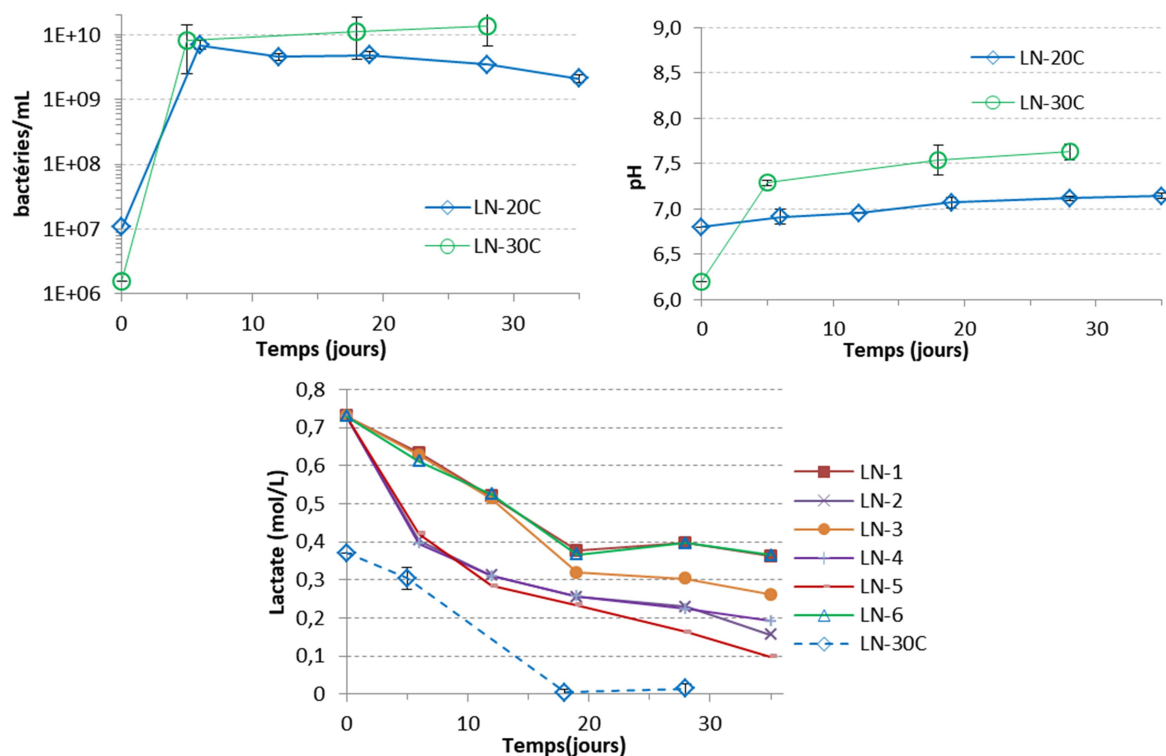


Figure 94 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LN à 20°C. En pointillés : suivi à 30°C (données de l'essai précédent).

L'évolution de la population bactérienne dans le milieu épaissi est identique à celle obtenue en milieu non épaissi (Figure 95). L'augmentation du pH est similaire en milieu non épaissi et en milieu épaissi, bien que légèrement plus rapide et plus importante en milieu épaissi, le pH se stabilisant à environ 7,5 contre 7,2 en milieu non épaissi. La consommation de lactate et la production de carbonate de calcium est très variable parmi les réplicats : trois réplicats sur six ont une consommation totale du lactate en 18 jours. Cette consommation rapide se traduit par une production de carbonate de calcium comprise entre 18 et 21 g/L (Tableau 23). Pour les trois autres réplicats, la consommation de lactate est plus lente et s'arrête au bout de 18 jours avec seulement 57 % du lactate ayant été consommé ; la production de carbonate de calcium est d'environ 8 g/L pour ceux-ci.

La très forte variabilité des résultats rend impossible la comparaison de la consommation de lactate ou de la production de CaCO_3 entre le milieu non épaissi et le milieu épaissi à 20°C. Toutefois, on peut observer qu'une consommation totale et rapide du lactate a pu être atteinte pour une partie des réplicats en milieu épaissi, ce qui n'est pas le cas en milieu non épaissi où la consommation de lactate reste inférieure à 86 %.

En milieu épaissi, la cinétique de croissance bactérienne est identique à 30°C et à 20°C. L'évolution du pH est plus lente à 20°C, mais au bout de 20 jours le pH est identique à celui mesuré à 30°C, entre 7,2 et 7,5. On observe que la consommation du lactate est aussi rapide qu'à 30°C pour la moitié des réplicats, bien que la consommation n'excède pas 50 % du lactate initial pour l'autre moitié. La production de carbonate de calcium reste inférieure à celle obtenue à 30°C quel que soit le réplicat considéré. La production de CaCO₃ maximale ayant été obtenue à 20°C (20,6 g/L) est inférieure de 23 % à celle obtenue à 30°C (26,7 g/L), la production de CaCO₃ est donc fortement réduite par le changement de température de 30°C à 20°C, même pour les échantillons où la consommation de lactate est totale.

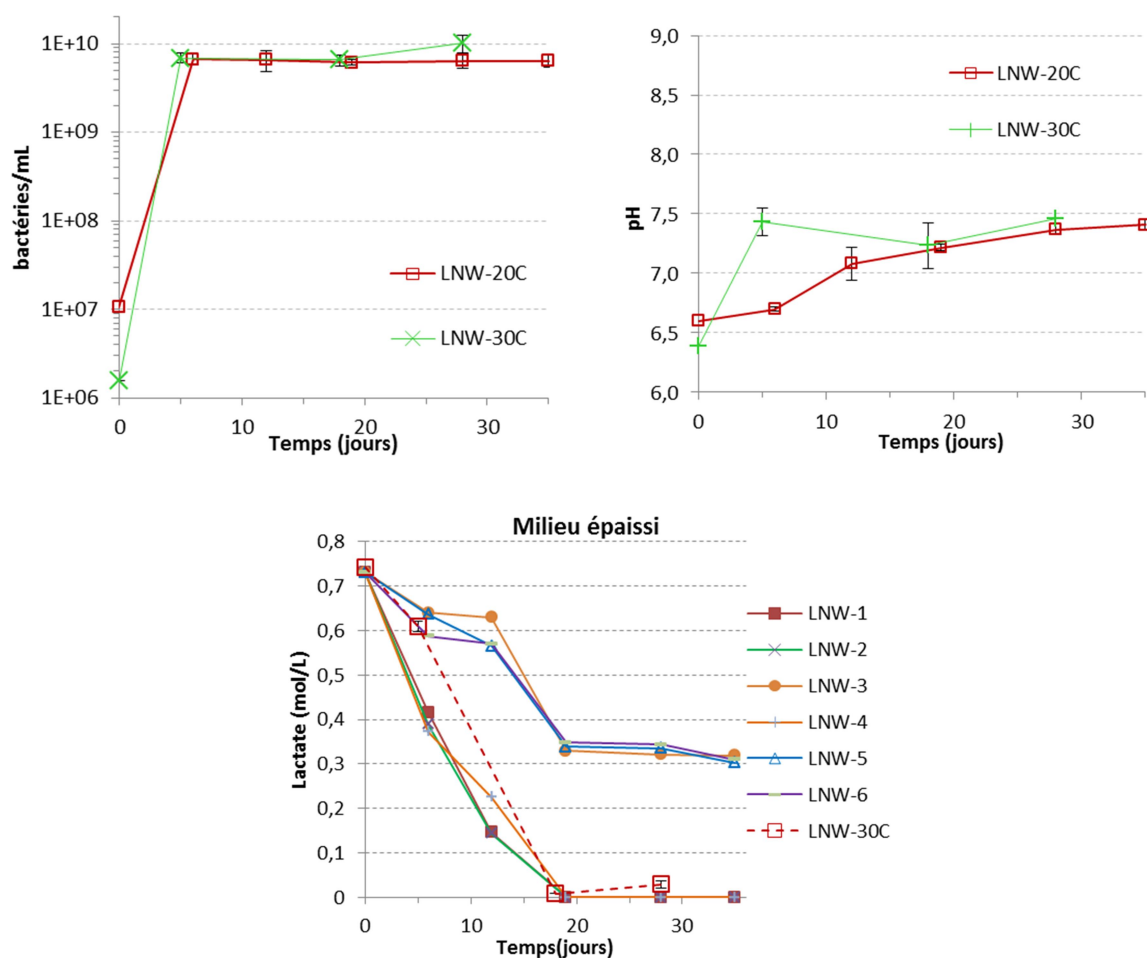


Figure 95 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LN à 20°C. En pointillés: suivi à 30°C (données de l'essai précédent).

Tableau 23 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieu LNW à 20°C.

Echantillon	LNW-1	LNW-2	LNW-3	LNW-4	LNW-5	LNW-6	Moyenne
Matière sèche récupérée (g/L)	83,27	81,11	78,51	80,79	78,86	78,58	80,2 (+/- 1,9)
Teneur en CaCO_3 du résidu sec (%)	33	32	19	32	19	19	26 (+/- 7)
CaCO_3 biogénéré (g/L)	20,6	19,0	7,8	18,5	7,6	8,0	13,6 (+/- 6,4)

5.3.1.3. Conclusion

Il est possible de conclure à la suite de ces essais que la bactérie étudiée présente une très forte variabilité morphologique, adoptée en réponse à la nature du milieu de biocatrisation et en particulier à la présence de nitrate de calcium. Bien que les bactéries puissent conserver une forme altérée de leur morphologie originelle en bacilles, les chaînes de bacilles allongés formés dans ces cas-là ne sont pas propices à une forte consommation du lactate de calcium et à une forte production de carbonate de calcium. Cette variabilité étant aussi présente au sein des précultures, il devient nécessaire de sélectionner les précultures ayant adopté la morphologie de cocci, afin de favoriser la production de carbonate de calcium lors de l'essai de croissance bactérienne.

La température s'est avérée être un facteur conditionnant la capacité de biominéralisation des bactéries, la baisse de température de 30°C à 20°C se traduisant par une variabilité importante de la production de carbonate de calcium et de la consommation de lactate (Figure 96). La production maximale de carbonate de calcium ayant pu être obtenue au cours de ces essais a été atteinte en milieu épaissi à 30°C, celle-ci est égale à 0,267 mol/L soit 26,7 g/L. Cette production est environ moitié moins importante que la quantité maximale de CaCO_3 pouvant être produite dans le milieu LN, qui est de 0,457 mol/L soit 45,78 g/L. Il y a donc une différence importante entre le potentiel de production de CaCO_3 théorique et la quantité réellement produite. Afin de maximiser la quantité de calcium disponible pour les bactéries et de fournir une source de carbone et de calcium supplémentaire pour les bactéries, les milieux des essais de croissance bactérienne seront par la suite dopés avec un apport de gluconate de calcium.

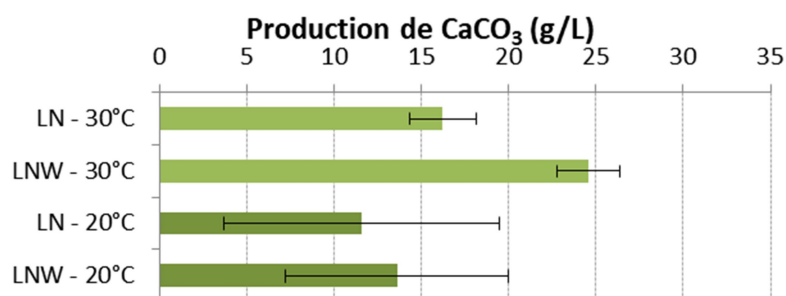


Figure 96 : Bilan de la production de carbonate de calcium au cours des essais de croissance bactérienne.

5.3.2. Effet du gluconate de calcium sur la croissance bactérienne

5.3.2.1. Essai de croissance à 30°C

Du gluconate de calcium est ajouté au milieu, afin d'apporter une source de calcium et de carbone supplémentaire pour la biominéralisation. Dans un premier temps, l'effet de l'ajout de gluconate de calcium est évalué à 30°C, pour être comparé aux résultats obtenus à 30°C en milieu LN (Figure 97). La population bactérienne atteint dès 8 jours la phase stationnaire et se maintient entre 1.10^{10} et $1,5.10^{10}$ bactéries/mL, de la même manière qu'en l'absence de gluconate, et les bactéries se présentent sous la forme de tétrades de cocci isolées. Le pH augmente plus lentement au cours de l'essai dans le milieu LNG que dans le milieu LN, mais se stabilise à 7,5, le pH final est donc identique. La consommation de lactate est identique en milieu LN et LNG, la totalité du précurseur étant consommé au bout de 18 jours. En outre, le gluconate n'est plus détectable sur les chromatogrammes après 22 jours de culture, ce qui indique qu'il a été consommé par les bactéries. La production de carbonate de calcium à la fin de l'essai est de 19,0 g/L (+/- 0,25 g/L) (Tableau 24), elle est donc supérieure à celle obtenue en l'absence de gluconate (16,2 g/L (+/- 1,8)).

L'ajout de gluconate à 30°C semble donc avoir un effet positif modéré sur la production de carbonate de calcium en milieu non épaissi, et ne pas avoir d'impact significatif sur la croissance bactérienne.

Tableau 24 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 30°C.

Echantillon	LNG-1	LNG-2	LNG-3	Moyenne	LNGW-4	LNGW-5	LNGW-6	Moyenne
Matière sèche récupérée (g/L)	27,32	27,47	27,26	27,4 (+/- 0,1)	91,16	89,08	91,62	90,6 (+/- 1,4)
Teneur en CaCO_3 du résidu sec (%)	70	69	69	69 (+/- 1)	30	33	30	31 (+/- 2)
CaCO_3 biogénéré (g/L)	19,2	18,9	18,8	19,0 (+/- 0,2)	20,1	22,1	20,5	20,9 (+/- 1,1)

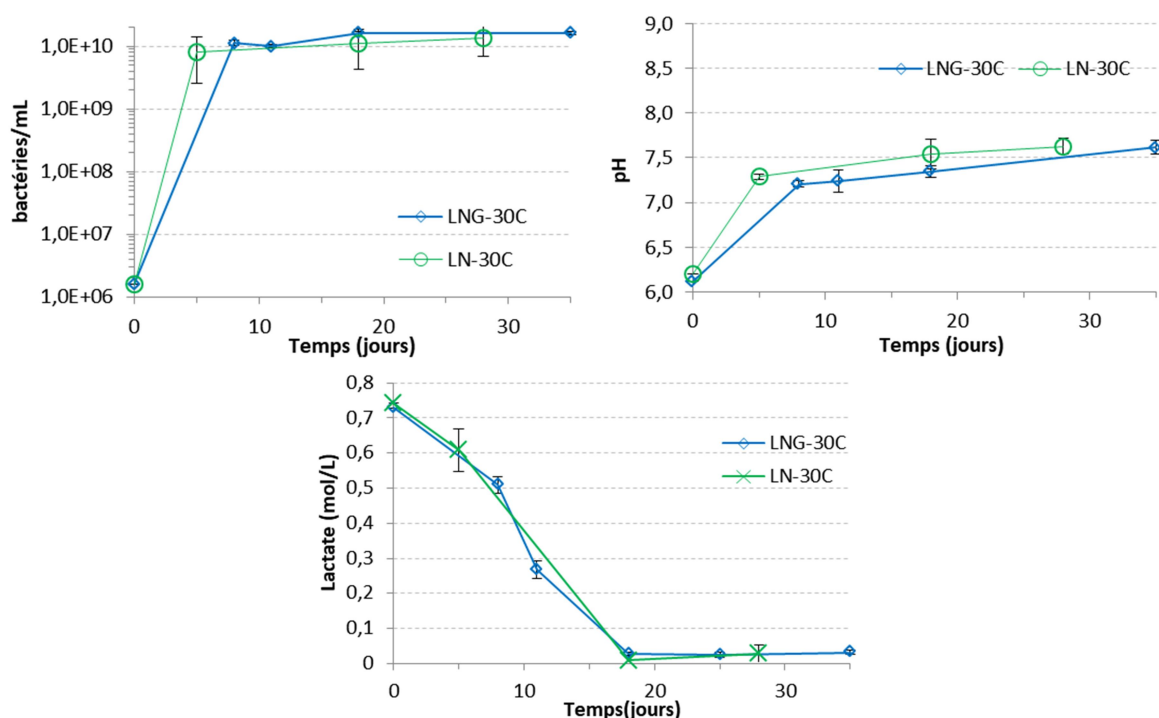


Figure 97 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LNG à 30°C, comparaison avec les résultats obtenus en milieu LN à 30°C.

La population bactérienne augmente à 5.10^9 bactéries/mL après 8 jours de culture pour se stabiliser entre $9.5.10^9$ et 1.10^{10} bactéries/mL durant le reste de l'essai, ce qui est légèrement plus faible qu'en milieu non épaissi. Les bactéries sont sous forme de cocci regroupées en clusters de plus de 50 bactéries, ce qui gêne le comptage et peut conduire à sous-estimer la population bactérienne. Comme dans le milieu non épaissi, le pH augmente progressivement pour se stabiliser autour de 7,5. La consommation de lactate est identique en milieu épaissi et en milieu non épaissi, avec une consommation totale du lactate et du gluconate au bout de 18 jours. La production de carbonate de calcium est légèrement plus élevée en milieu épaissi qu'en milieu non épaissi (Tableau 24).

L'épaississement du milieu en présence de gluconate de calcium a donc un effet limité sur la croissance et l'activité bactériennes à 30°C, bien qu'il semble provoquer l'agglomération des bactéries sous forme de clusters.

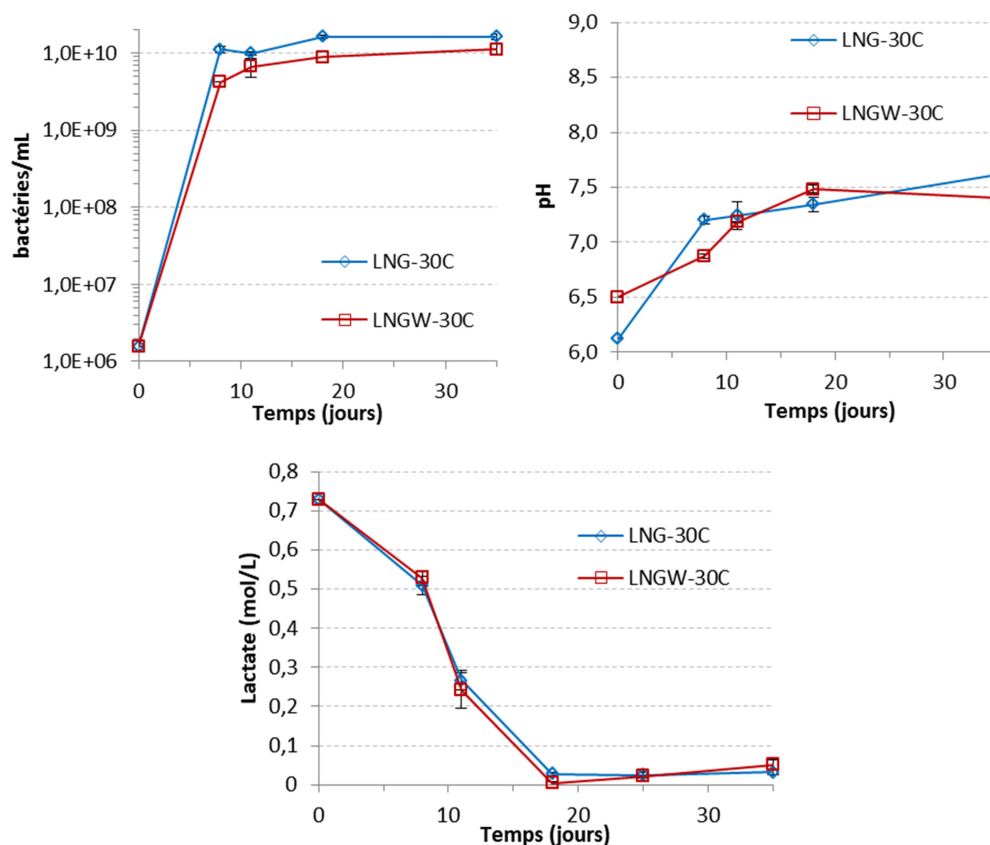


Figure 98 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LNG à 30°C, comparaison avec les résultats obtenus en milieu LNGW à 30°C.

5.3.2.2. Essais de croissance bactérienne à 20°C

Dans le milieu LNG à 20°C, la population bactérienne atteint la fin de la phase exponentielle de croissance après 6 jours de culture, et se maintient à 1.10¹⁰ cellules/mL jusqu'à la fin de l'essai avec de faibles écart-types (Figure 99). Les bactéries se présentent sous forme de tétrades de cocci, regroupées en clusters de 5 à 20 tétrades. Le pH augmente progressivement de 6,5 à 7,5 durant les 35 jours de l'essai, et semble encore en cours d'augmentation en fin d'essai. La consommation de lactate est progressive, et après 35 jours plus de 80 % du lactate a été consommé, ainsi qu'une partie du gluconate. A la fin de l'essai, 16,9 g/L (+/- 0,2 g/L) de carbonate de calcium sont formés (Tableau 25).

On observe que la variabilité de la production de carbonate de calcium est faible malgré la variabilité mesurée au niveau de la consommation de lactate. Par rapport à l'essai mené en l'absence de gluconate de calcium (LN) à 20°C, la population bactérienne moyenne est deux fois plus élevée en milieu LNG, et le pH légèrement supérieur. Enfin, la consommation de lactate et la production de CaCO_3 sont plus reproductibles au cours de l'essai en milieu LNG qu'en milieu LN, ce qui pourrait être dû à la plus grande abondance de carbone utilisable par les bactéries.

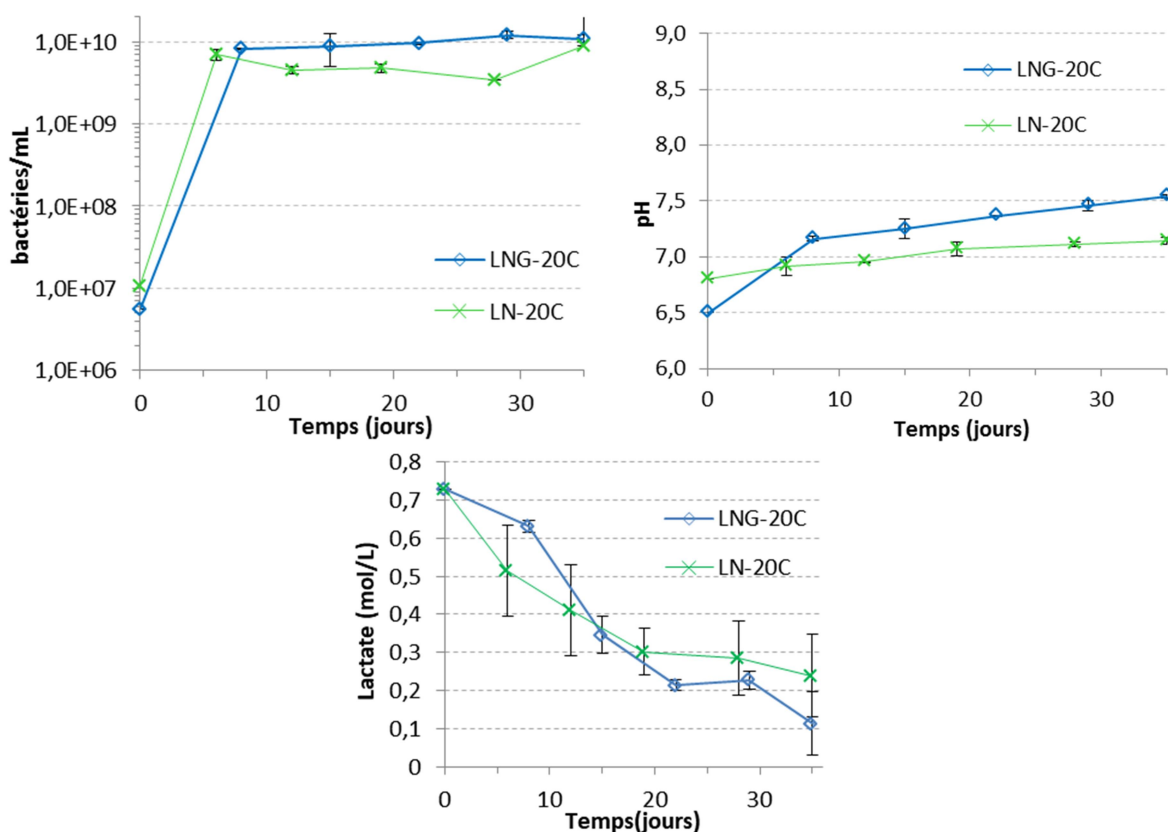


Figure 99 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieu LNG, à 20°C, comparaison avec les résultats obtenus en milieu LN à 20°C.

Tableau 25 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 20°C.

Echantillon	LNG-1	LNG-2	LNG-3	Moyenne	LNGW-1	LNGW-2	LNGW-3	Moyenne
Matière sèche récupérée (g/L)	20,4	20,4	20,8	20,5 (+/- 0,2)	84,4	92,9	88,6	88,7 (+/- 4,3)
Teneur en CaCO_3 du résidu sec (%)	82	82	83	82 (+/- 1)	29	33	24	28 (+/- 5)
CaCO_3 biogénéré (g/L)	16,8	16,8	17,2	16,9 (+/- 0,2)	17,3	23,4	14,0	18,3 (+/- 4,8)

En milieu épaissi, la cinétique de croissance bactérienne est proche de celle obtenue en milieu non épaissi (Figure 100), mais on observe un regroupement progressif des cocci en clusters massifs au cours du temps. En outre, la population bactérienne en milieu épaissi diminue progressivement au cours de l'essai, ce qui peut être dû à la formation de clusters puisque ceux-ci rendent difficiles le dénombrement des bactéries. En fin d'essai, le pH de la culture et la consommation de lactate sont similaires en milieu épaissi et en milieu non épaissi, malgré de légers écarts observés en cours de culture.

En fin de culture, la production de carbonate de calcium est similaire en milieux épaissi et non épaissi : elle est de 16,9 g/L (+/- 0,2 g/L) en milieu non épaissi contre 18,3 g/L (+/- 4,8 g/L) en milieu épaissi. On constate des variations relativement importantes entre réplicats pour la production de carbonate de calcium dans le milieu épaissi, avec des productions de 14,1, 17,3 et 23,3 g/L pour chacun des trois réplicats étudiés (Tableau 25).

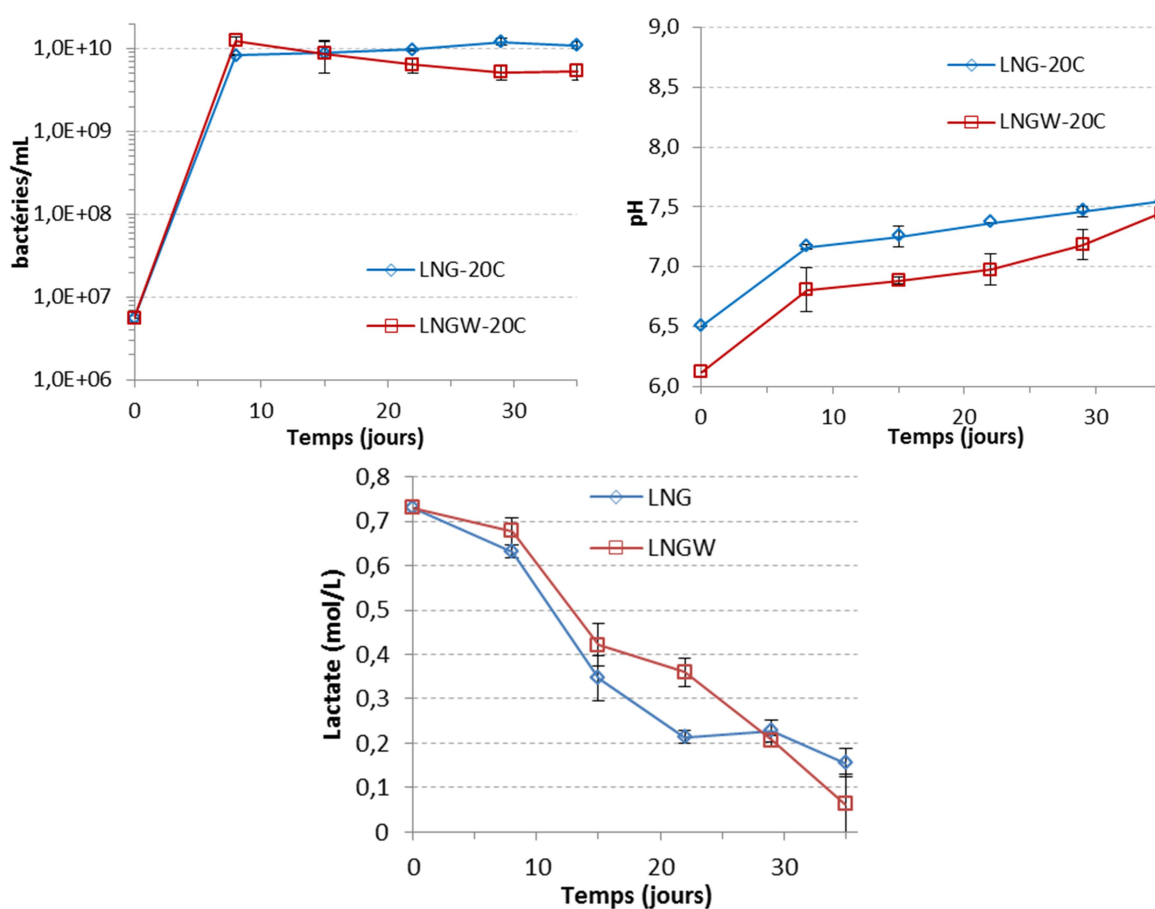


Figure 100 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieux LNG et LNGW, à 20°C.

5.3.2.3. Conclusion

L'ajout de gluconate de calcium n'a pas d'effet significatif sur les résultats à 30°C, mais semble permettre de meilleurs résultats à 20°C en réduisant la variabilité de la consommation de lactate et de la production de carbonate de calcium en milieu épaissi et en milieu non épaissi. En outre, il permet d'augmenter de 10 % la teneur en calcium du milieu, un atout important étant donné que l'apport de calcium est le principal facteur limitant du processus de biocicatrisation. Les prochains essais seront donc réalisés en milieux LNG et LNGW.

Toutefois, on constate que la production de carbonate de calcium à 20°C reste soumise à une forte variabilité, avec une production variant entre 14 et 23 g/L dans le milieu épaissi enrichi en gluconate de calcium. Or, l'application réelle de la biocicatrisation implique de pouvoir produire du carbonate de calcium de manière fiable à 20°C pour être adaptée au climat des régions tempérées. Il est donc nécessaire de modifier encore le protocole expérimental pour assurer une plus grande fiabilité de la méthode. Pour atteindre cet objectif, les essais suivants visent à stabiliser la morphologie cellulaire avant l'inoculation de l'essai de croissance *via* la modification de la préculture.

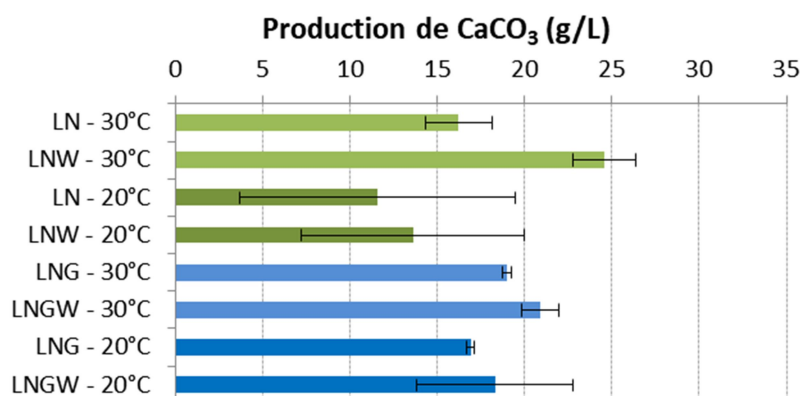


Figure 101 : Bilan de la production de carbonate de calcium au cours des essais de croissance bactérienne.

5.3.3. Optimisation de l'inoculum bactérien

Les essais réalisés ont montré la nécessité d'employer des bactéries sous la forme « cocci » plutôt que sous la forme « bacille » pour obtenir une reproductibilité des essais et une production de carbonate de calcium satisfaisantes. Au cours de cette partie, nous évaluons deux méthodes visant à stabiliser la forme cocci :

- l'augmentation de la concentration en nitrate de calcium de 12 à 24 g/L dans le milieu NBN pour les précultures,
- le remplacement des cryotubes sous forme « bacille » par des cryotubes sous forme « cocci » cultivés en milieu NBN (12 g/L de nitrate de calcium).

La première méthode se base sur le fait que le changement de forme des bactéries est une réponse à la présence de nitrate de calcium dans le milieu NBN, facteur de stress pour les bactéries [192]. Augmenter l'intensité de ce stress pourrait systématiser cette adaptation et ainsi stabiliser les précultures, mais aussi acclimater plus efficacement les bactéries au milieu LN ou milieu LNG riche en nitrate de calcium (47 g/L) utilisé pour les essais de croissance bactérienne. La deuxième méthode consiste à utiliser *B. pseudofirmus* sous forme cocci dès la première phase de conservation, afin de s'assurer de la stabilité de cette morphologie.

L'augmentation de la concentration en nitrate de calcium dans les précultures vise à appliquer une pression plus forte sur les bactéries et ainsi forcer celles-ci à adopter systématiquement la morphologie souhaitée. Six précultures en milieu NBN dopé (contenant 24 g/L de nitrate de calcium, au lieu de 12 g/L pour le milieu NBN standard) sont réalisées, afin d'éliminer les cultures sous forme bacille et favoriser la forme cocci. L'augmentation de la concentration en nitrate de calcium se traduit par un allongement de la phase de latence pour les cultures adoptant la forme cocci, et la phase stationnaire est atteinte au bout de 50 h, contre 40 h dans le milieu NBN à 12 g/L de nitrate de calcium. Toutefois, on observe que deux réplicats parmi les six se développent sous forme de bacilles, à un rythme ralenti. En répétant l'essai, trois réplicats sur six ont adopté la forme « cocci ». Augmenter la concentration en nitrate de calcium dans la préculture NBN ne permet donc pas de réduire la variabilité de morphologies des précultures. Cette modification des conditions de culture n'ayant apporté aucun bénéfice, aucun essai de croissance bactérienne n'a été réalisé à partir de ces précultures.

Afin de pallier l'instabilité de la morphologie des cultures et de n'obtenir que des cultures sous forme de cocci, nous avons produit des cryotubes de culture sous forme cocci en milieu NBN. Les précultures réalisées en milieu NBN à l'aide de ces cryotubes permettent d'obtenir systématiquement des bactéries sous forme de cocci isolés ou regroupés en petits clusters de moins de 20 cellules. Ces précultures croissent rapidement sans phase de latence, et la phase stationnaire est atteinte après 25 à 30 heures, pour une population bactérienne comprise entre $3 \cdot 10^9$ et $5 \cdot 10^9$ bactéries/mL (Figure 102).

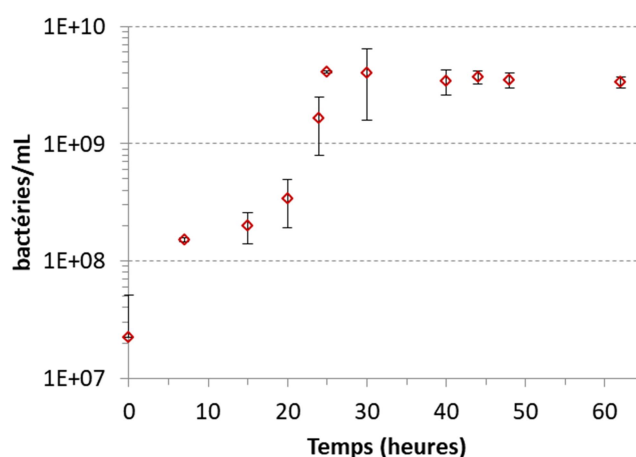


Figure 102 : Croissance bactérienne dans la préculture NBN inoculée à partir de cryotubes préparés en milieu NBN.

Des précultures à 30°C réalisées dans le milieu LNG sont inoculées à l'aide de cryotubes contenant les bactéries sous forme cocci. Réaliser des précultures dans le même milieu que les essais de croissance pourrait en effet améliorer l'acclimatation des bactéries, et ainsi offrir de meilleures conditions pour la précipitation de carbonate de calcium, et par conséquent une amélioration de la fiabilité et de la performance du procédé. Les bactéries présentent la même morphologie dans les précultures en milieu LNG que dans les précultures en milieu NBN, étant sous la forme de cocci, regroupés en tétrades ou en clusters de moins de 20 cellules. En revanche, la croissance dans ce milieu est plus lente que dans le milieu NBN et la phase stationnaire est atteinte au bout de 50 heures environ. Ce ralentissement de la croissance bactérienne peut être expliqué d'une part par la plus faible teneur en nutriments dans le milieu LNG par rapport au milieu NBN, ainsi que par sa plus forte teneur en nitrate de calcium, source de stress pour les bactéries.

5.3.3.1. Conclusion

L'utilisation d'un milieu de préculture NBN plus concentré en nitrate de calcium ne permet pas de stabiliser la morphologie des bactéries sous la forme « cocci » et cette méthode est donc abandonnée. En revanche, en inoculant les précultures depuis des cryotubes contenant des bactéries ayant déjà adopté la forme « cocci », il est possible d'obtenir de manière répétable des précultures de *Bacillus pseudofirmus* sous forme de cocci, dont la morphologie et la cinétique de croissance sont constants pour des conditions de culture données. La modification des cryotubes a par conséquent permis d'améliorer la répétabilité des précultures. A partir de ces inoculats, il a été possible de réaliser des précultures en milieu NBN mais aussi en milieu LNG. Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer lequel de ces deux milieux est le plus intéressant pour la réalisation de précultures, puisque les deux milieux utilisés ont permis d'obtenir des précultures sous forme « cocci » en moins de 50 h. Les essais suivants ont donc pour objectif d'évaluer les avantages apportés par l'utilisation d'un inoculum optimisé (sous forme cocci et concentré), et de déterminer quel milieu de préculture (NBN ou LNG) permet une production maximale de carbonate de calcium.

Afin d'encore améliorer la reproductibilité des essais et la production de carbonate de calcium, l'emploi de cryotubes sous la forme « cocci » est combinée à l'emploi d'un inoculum concentré : 100 mL de préculture en milieu NBN ou LNG ont été centrifugées en début de phase stationnaire de croissance puis le culot de centrifugation a été utilisé en entier pour inoculer 100 mL de milieu LNG/LNGW. Par rapport à un essai inoculé à l'aide d'un aliquote, la concentration cellulaire initiale est mille fois supérieure dans ce cas-ci et la population bactérienne est à son maximum théorique dès le début de l'essai. Cette modification de protocole maximise les chances de survie des bactéries et permet au processus de biominéralisation d'être à son rythme maximal dès l'inoculation.

5.3.4. Effet d'un inoculum concentré sur la croissance bactérienne

L'emploi de cryotubes de bactéries sous forme cocci en milieu NBN a permis d'obtenir des précultures présentant systématiquement le phénotype cocci, que ce soit dans le milieu NBN ou LNG, et ainsi éliminer la variabilité de morphologie posant problème lors des essais précédents. Cette partie a pour objectif de vérifier lequel de ces deux milieux utilisés pour les précultures est le plus intéressant pour la production de carbonate de calcium lors de l'essai de croissance, à travers des essais employant des inoculats concentrés obtenus depuis une préculture en milieu NBN et en milieu LNG. Les essais sont réalisés à 20°C, et sont préparés à partir de cryotubes de milieu NBN contenant les bactéries sous forme « cocci ».

5.3.4.1. Croissance bactérienne depuis une préculture LNG

La Figure 103 présente les résultats de l'essai de croissance réalisé dans les milieux LNG et LNGW à partir d'un inoculum optimisé et concentré et d'une préculture en milieu LNG. Pour cet essai, les mesures sont réalisées en duplicats. Dans le milieu non épaissi, on observe que la concentration cellulaire est proche de la population maximale de la culture dès le début de l'essai, et n'augmente que légèrement au cours de l'essai (Figure 103). Les bactéries se présentent sous la forme cocci durant toute la culture, les cellules étant regroupées en petits clusters.

On observe en revanche une variabilité en milieu épaissi, pour lequel on observe soit un mélange de différentes formes (clusters massifs de cocci, spores et chaînes de bacilles) soit des cocci assemblées en paires ou en petits clusters. Le pH augmente rapidement en milieu non épaissi pour se stabiliser à 7,6 après 10 jours, en milieu épaissi il augmente progressivement pour se stabiliser à 7,3 après 20 jours.

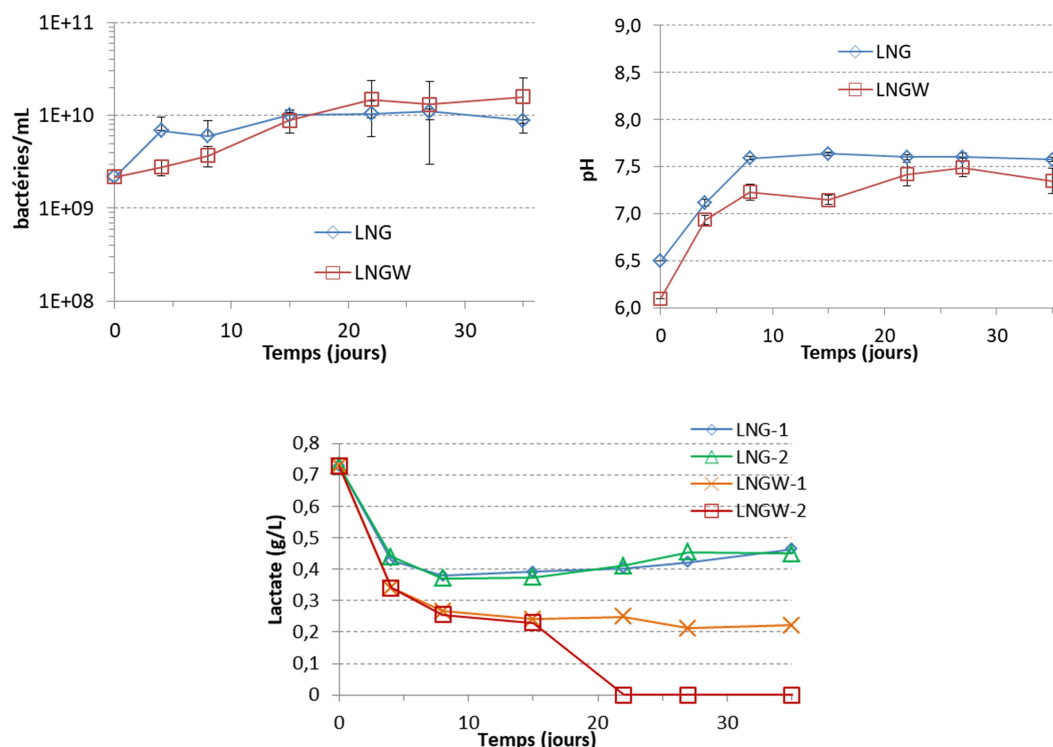


Figure 103 : Suivi d'essai de croissance bactérienne en milieux LNG et LNGW à 20°C, depuis une préculture LNG concentrée.

La consommation de lactate est faible en milieu non épaissi, avec seulement 47 % du lactate consommé. En milieu épaissi, la consommation de lactate de calcium est de 70 % pour le premier réplicat, et de 100 % pour le deuxième réplicat. On n'observe pas de consommation de gluconate de calcium en milieu non épaissi, mais il y a une consommation partielle du gluconate en milieu épaissi, respectivement de 55 % et de 17 % dans les deux réplicats.

La production de carbonate de calcium est limitée en milieu non épaissi, égale à 8,5 g/L (+/- 0,3 g/L) pour une production de biomasse de 12,1 g/L (+/- 0,3 g/L). Elle est en revanche importante en milieu épaissi, avec 26,7 g/L (+/- 4,2 g/L) de carbonate de calcium pour une production de biomasse de 39,7 g/L (+/- 4,9 g/L). On note une variabilité de la production de carbonate de calcium en milieu épaissi, pouvant découler de la différence de morphologie observée entre les deux réplicats réalisés : l'échantillon ayant adopté la forme cocci arrangée en paires produit 29,7 g/L de carbonate de calcium, et celui présentant un mélange de morphologies produit 23,7 g/L de carbonate de calcium. Ces différences de production sont cohérentes avec les différences de consommation de lactate observées, l'échantillon ayant produit le plus de CaCO_3 étant celui qui a consommé la totalité du lactate.

Tableau 26 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 20°C, depuis une préculture LNG concentrée.

Echantillon	LNG-1	LNG-2	Moyenne	LNGW-1	LNGW-2	Moyenne
Matière sèche récupérée (g/L)	11,90	12,28	12,1 (+/- 0,3)	99,3	106,1	102,7 (+/- 4,9)
Teneur en CaCO_3 du résidu sec (%)	70	71	70 (+/- 1)	31	35	33 (+/- 3)
CaCO_3 biogénéré (g/L)	8,3	8,7	8,5 (+/- 0,3)	23,7	29,7	26,7 (4,2)

Les résultats obtenus au cours de cet essai montrent que l'utilisation d'un inoculum concentré permet d'obtenir une production de carbonate de calcium importante en milieu épaissi, avec une consommation partielle du gluconate. L'essai révèle toutefois une variabilité de la consommation du lactate entre les deux réplicats réalisés en milieu épaissi, et la production de carbonate de calcium en milieu non épaissi est faible. Ce protocole expérimental présente donc toujours des faiblesses malgré la forte production de CaCO_3 ayant été atteinte en milieu épaissi.

5.3.4.2. Essai de croissance bactérienne depuis une préculture NBN

La Figure 104 présente les résultats de l'essai de croissance réalisé dans les milieux LNG et LNGW à partir d'un inoculum amélioré et concentré et d'une préculture en milieu NBN. Comme cela a été observé au cours de l'essai précédent, la concentration cellulaire initiale est déjà proche de la population maximale de la culture dès le début de l'essai, et n'augmente pas au cours de l'essai (Figure 104). Une baisse progressive de la population bactérienne est toutefois observable dans la culture épaissie : de la même manière que pour les cultures issues de cryotubes en milieu NB (Figure 99, section 5.3.2).

Cette baisse de densité bactérienne est partiellement expliquée par la formation de clusters de cocci massifs dans la culture épaissie, qui rendent le comptage cellulaire difficile. Une augmentation progressive du pH est observée jusqu'à une valeur finale de 7,5 au bout de 35 jours en

milieu épaissi comme en milieu non épaissi. La consommation du lactate est rapide et débute dès le début de la culture. Au bout de 20 jours, tout le lactate est consommé en milieu épaissi pour les trois réplicats, mais il reste une faible quantité de lactate dans le milieu non épaissi, ce qui se traduit par une production de carbonate de calcium légèrement inférieure en milieu non épaissi

En milieu non épaissi, la production moyenne de carbonate de calcium est de 17,0 g/L (+/- 0,9 g/L) et présente donc une bonne reproductibilité. En milieu épaissi, la production moyenne de CaCO_3 est de 25,1 g/L (+/- 3,0 g/L). Comme la masse molaire du carbonate de calcium est égale à 100,08 g/mol, 0,25 mol/L de carbonate de calcium ont été produits : environ 50 % des atomes de calcium présents dans le milieu épaissi ont été utilisés pour former du CaCO_3 .

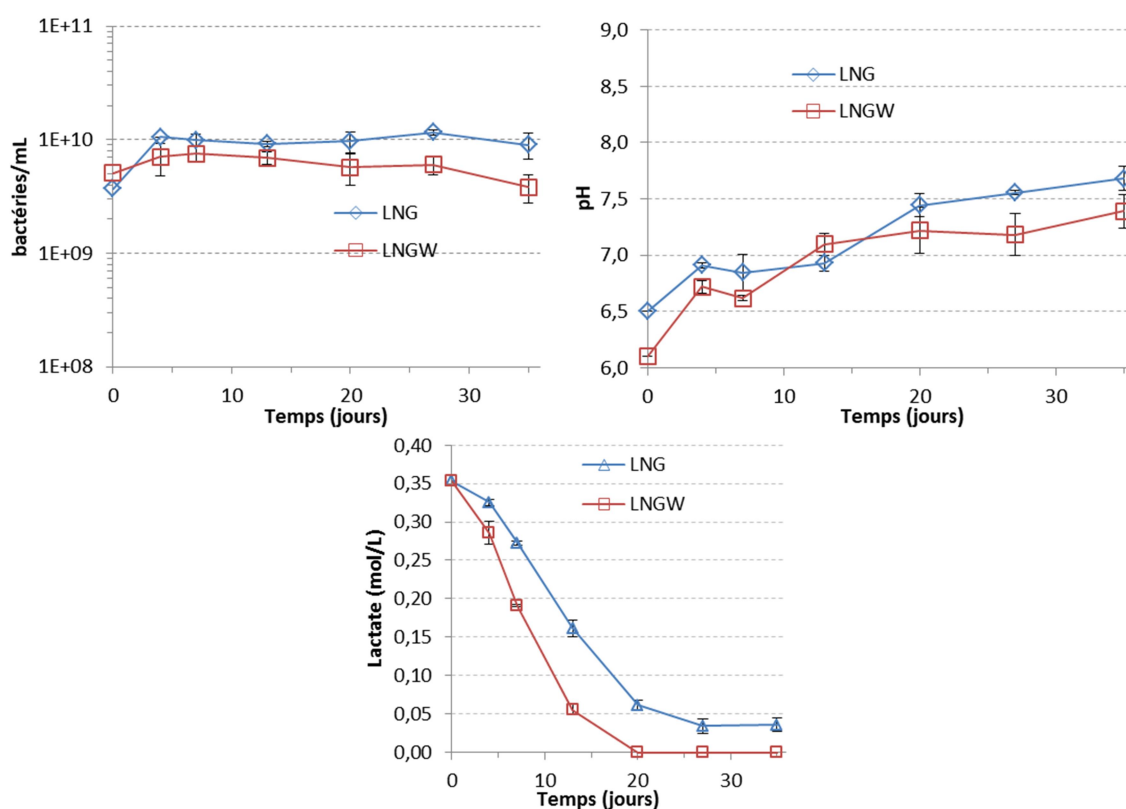


Figure 104 : Suivi d'essai de croissance en milieu LNG à 20°C, depuis une préculture NBN optimisée et concentrée.

Tableau 27 : Teneur en matière sèche et production de CaCO_3 en milieux LNG et LNGW à 20°C, depuis une préculture NBN concentrée.

Echantillon	LNG-1	LNG-2	LNG-3	Moyenne	LNGW-1	LNGW-2	LNGW-3	Moyenne
Matière sèche récupérée (g/L)	19,7	21,2	20,3	20,4 (+/- 0,8)	94,3	88,3	88,5	90,3 (+/- 3,4)
Teneur en CaCO_3 du résidu sec (%)	83 %	84 %	85 %	84 (+/- 1)	38 %	34 %	35 %	36 (+/- 2)
CaCO_3 biogénéré (g/L)	16,4	17,7	17,2	17,1 (+/- 0,7)	28,5	23,2	23,6	25,1 (+/- 3,0)

Les résultats obtenus montrent que l'inoculation du milieu LNG ou du milieu LNGW à l'aide d'un inoculum concentré issu d'une préculture en milieu NBN inoculée à l'aide de bactéries sous forme « cocci » permet une production maximale de CaCO_3 à 20°C avec une bonne répétabilité entre les réplicats réalisés.

5.3.4.3. Conclusion

Cet essai montre que l'emploi d'inoculats concentrés à la place d'aliquotes améliore nettement le rendement et la reproductibilité des essais. En effet, on observe une consommation rapide et quasiment totale du lactate au cours de l'essai réalisé à partir d'une préculture NBN, ce qui se traduit par la production d'environ 25 g/L de CaCO_3 en milieu épaissi et d'environ 17 g/L de CaCO_3 en milieu non épaissi. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus à 30°C, et révèlent que l'optimisation du milieu de culture bactérienne et de l'inoculum bactérien ont permis de favoriser le processus de biominéralisation à 20°C.

En revanche, l'utilisation d'une préculture LNG permet de produire plus de 26 g/L de CaCO_3 en milieu épaissi, mais la consommation de lactate varie entre les échantillons, et la production de CaCO_3 est faible en milieu non épaissi, n'excédant pas 10 g/L. Ce type de préculture est donc moins intéressant qu'une préculture en milieu NBN, puisqu'il est moins fiable.

5.3.5. Conclusion des essais de croissance bactérienne

Les essais de croissance de *B. pseudofirmus* réalisés ont permis de sensiblement améliorer la production de carbonate de calcium ainsi que de rendre la méthode plus robuste, par le biais de modifications successives du protocole expérimental. Ce processus a en outre permis d'étudier en détail la souche de *Bacillus pseudofirmus* étudiée, de connaître ses caractéristiques de croissance et son comportement en fonction du milieu de culture employé et des contraintes appliquées, en milieu non épaissi comme en milieu épaissi. Il a pu être observé au cours de ces essais que cette bactérie peut modifier de manière drastique sa morphologie en réponse aux modifications des conditions de culture, ce qui se traduit par une très forte variabilité des résultats et à une production de carbonate de calcium instable, ce qui constitue une menace pour la bonne conduite de la biocicatrisation des fissures.

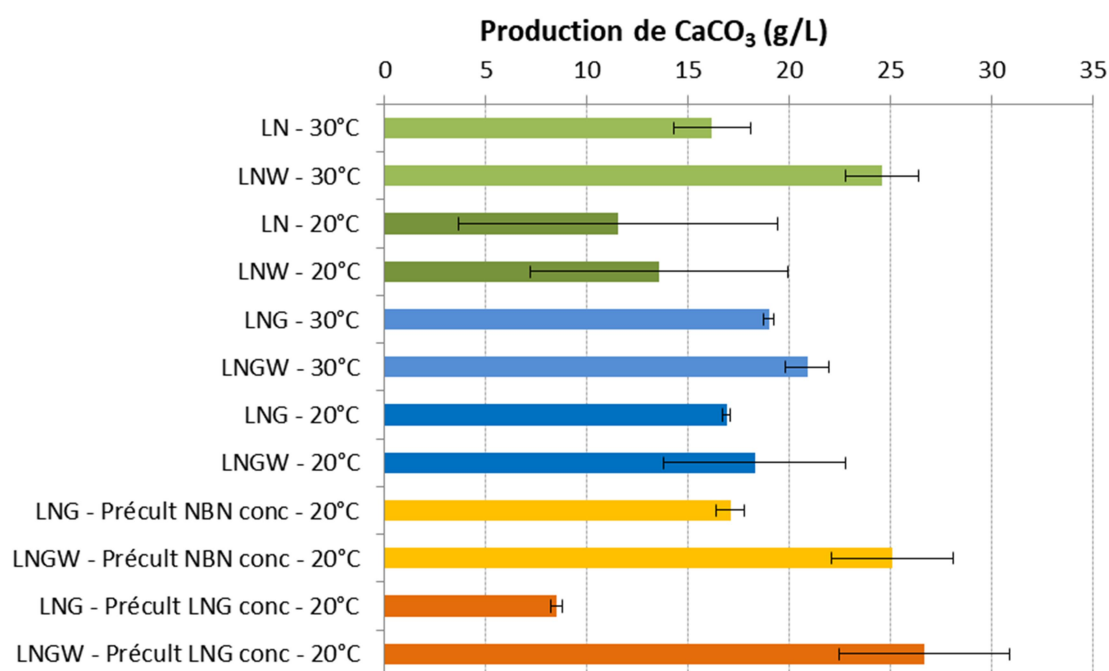


Figure 105 : Bilan de la production de carbonate de calcium au cours des essais de croissance bactérienne.

Plusieurs modifications ont donc été réalisées afin de pallier cet obstacle :

- En premier lieu, le milieu de culture des essais de croissance est complété par ajout de 20 g/L de gluconate de calcium. L'ajout de gluconate de calcium au milieu augmente la quantité de carbone et de calcium disponible pour former du carbonate de calcium, et a un effet stabilisateur suspecté sur les bactéries lors de l'essai de croissance.
- Les cryotubes sont préparés à partir de cultures ayant déjà adopté la morphologie cocci permettant la plus forte production de carbonate de calcium, plutôt que sous la forme bacille initiale.
- Pour maximiser l'efficacité du procédé dès l'inoculation des essais, ceux-ci sont inoculés à l'aide d'un culot de préculture centrifugé plutôt qu'à l'aide d'aliquotes, multipliant la population initiale par mille et favorisant une production rapide de carbonate de calcium.
- Enfin, le milieu NBN est utilisé pour réaliser les précultures à 30°C, celui-ci assurant des résultats plus fiables qu'une préculture réalisée en milieu LNG, et permettant d'obtenir une population bactérienne de 1.10^9 bactéries/mL en 24 heures au lieu du double en milieu LNG.

Ces modifications de protocole permettent d'obtenir entre 20 et 25 g/L de carbonate de calcium à 20°C au bout de 35 jours, production largement supérieure à celles obtenues dans tous les essais à 20°C, et même légèrement supérieure à celle obtenue à 30°C. Les autres études portant sur la biominéralisation ne réalisent pas de quantification du carbonate de calcium produit, ce qui rend difficile leur comparaison avec ces résultats. En revanche, l'étude de la biocicatrisation par *B.pseudofirmus* par Ducasse-Lapeyrousse (2014) [5] présente une quantification de la biominéralisation. A 30°C en milieu LN, les essais de Ducasse-Lapeyrousse ont permis la production de 7,6 g/L (+/- 1,1 g/L) de CaCO_3 après 31 jours de culture. La production de carbonate de calcium a donc été multipliée par plus de trois au cours des essais de croissance bactérienne réalisés durant cette thèse. De plus, la période de préculture bactérienne était auparavant de 11 jours et a été réduite à moins de deux jours.

CHAPITRE 6.

Essais de biocicatrisation de mortiers fissurés

6.1. Introduction

Ce chapitre vise à appliquer la méthode d'exobiocicatrisation développée au cours de ce projet sur des fissures réalistes d'ouverture comprise entre 150 et 500 μm dans des conditions de stérilité, d'hygrométrie et de température contrôlées. Cette méthode a été mise au point sur la base des essais de rhéologie et de croissance bactérienne réalisés précédemment : le milieu LNGW permet une injection efficace au sein de la fissure en assurant un taux de remplissage maximal et en évitant le drainage du milieu hors de la fissure suite à l'injection, et permet la bioprécipitation de quantités importantes de carbonate de calcium par *Bacillus pseudofirmus* à 20°C. La réduction de la perméabilité à l'air des fissures est utilisée pour quantifier le colmatage des fissures. En complément de ces mesures, la nature de la couche de colmatage, sa résistance aux fortes pressions et sa résistance au lessivage sont évaluées.

Ces expérimentations visent à connaître le potentiel de biocicatrisation des bactéries dans le milieu sélectionné, dans des conditions de culture contrôlées. Les fissures sont donc soumises à des conditions environnementales proches de celles appliquées lors des essais de croissance bactérienne : elles sont maintenues à 20°C dans un environnement stérile saturé en humidité. Dans un deuxième temps, des essais de biocicatrisation sont réalisés en milieu extérieur, dans le but d'étudier les contraintes apportées par le milieu extérieur au processus. Plusieurs facteurs peuvent toutefois différer des essais en erlenmeyer et influencer le potentiel de biocicatrisation :

- Les bétons et mortiers ont une forte capacité d'absorption de l'eau, et peuvent donc assécher la fissure même dans une atmosphère saturée en humidité. L'activité bactérienne étant tributaire de la présence d'eau, le maintien d'eau libre au sein de la fissure est primordial ;
- En l'absence d'agitation et dans une fissure fine, les couches profondes de la fissure ont peu d'échanges chimiques avec l'extérieur, ce qui limite le renouvellement des nutriments mais aussi des gaz au sein de la fissure. En cas d'épuisement du dioxygène dissous, l'activité des bactéries aérobies est réduite, voire stoppée, ce qui limite le processus de biominéralisation.

6.2. Matériel et méthodes

L'essai de biocicatrisation en conditions contrôlées consiste à inoculer des fissures d'ouverture comprise entre 150 et 500 μm à l'aide d'une culture de *Bacillus pseudofirmus* en milieu adapté (LNGW), puis maintenir les échantillons dans un environnement contrôlé propice à la biocicatrisation durant quatre mois, afin de colmater les fissures par bioprécipitation de carbonate de calcium. Les essais de biocicatrisation *in vitro* sont réalisés suivant les étapes suivantes, en conditions stériles :

- Préparation des éprouvettes de mortier et détermination de l'ouverture apparente des fissures *via* la mesure de leur perméabilité à l'air, stérilisation des enceintes de biocicatrisation, des éprouvettes fissurées et du milieu d'injection ;
- Etude de l'impact de l'injection du milieu épaissi sur la perméabilité à l'air des fissures ;
- Inoculation du milieu d'injection dans la fissure, puis stockage en milieu stérile, à 100 % d'humidité relative (HR) et à 20°C, durant 4 mois, selon les étapes présentées dans le Tableau 29 ;
- A la fin de l'essai, mesure de la perméabilité à l'air des échantillons fissurés, caractérisation de la nature et des propriétés de la couche de colmatage au sein de la fissure (observations et analyses par MEB, mesure de la résistance à la pression et au lessivage).

6.2.1. Préparation des éprouvettes de mortier fissurées

Les essais de biocicatrisation utilisent des éprouvettes de mortier fissurées préparées selon la méthode décrite dans le chapitre « Caractérisation du mélange Welan-Attagel ». Des fissures de 150 à 500 μm d'ouverture sont pratiquées dans des éprouvettes de mortier à l'aide de cœurs expansifs, puis les éprouvettes sont carbonatées dans une chambre de carbonatation à 20°C, 4 % de CO_2 et 40 % d'humidité durant un mois. Pour les essais de biocicatrisation, les cœurs expansifs sont ensuite retirés pour être remplacés par un cœur plein en cire de paraffine. L'orifice central de l'éprouvette est au préalable protégé à l'aide de ruban adhésif, puis de la cire de paraffine fondue y est coulée en veillant à ne pas contaminer la fissure étudiée.

Après refroidissement, le cœur de cire est arasé de manière à ce que les surfaces inférieure et supérieure de l'éprouvette soient planes. Cette opération facilite la mise en œuvre des mesures de perméabilité à l'air et est indispensable pour réaliser les mesures sous haute pression réalisées en fin d'essai.

6.2.2. Mesure de l'ouverture des fissures

La mesure de la perméabilité à l'air des échantillons de mortier fissurés permet de suivre le colmatage des fissures de manière rapide et sans altérer les produits formés au sein des fissures. Pour mesurer la perméabilité à l'air, l'éprouvette sèche est recouverte d'adhésif sur toute sa surface excepté celle de la fissure, afin de supprimer le biais dû à la perméabilité à l'air du mortier et à la présence de microfissures invisibles à l'œil nu. L'éprouvette est ensuite placée dans la cellule de perméabilité (Figure 106). Une pression de 1 bar est appliquée dans le boudin de confinement afin d'empêcher l'air de passer à l'extérieur de la fissure, puis l'échantillon est soumis à une pression d'entrée forçant le passage de l'air à travers la fissure. Le débit de sortie est mesuré à l'aide d'un débitmètre massique (Massview MV-104, Bronkhorst), pour des pressions d'entrée de 0,2 et de 0,5 bar. L'adhésif recouvrant la surface de l'éprouvette est retiré après les mesures de perméabilité à l'air.

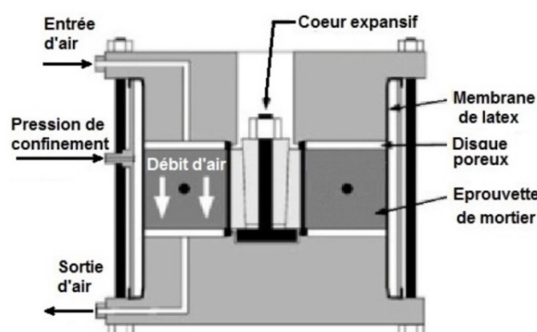


Figure 106 : Dispositif de mesure de la perméabilité à l'air.

L'ouverture réelle des fissures est estimée en mesurant l'écart entre les lèvres de la fissure en 24 points répartis sur la face inférieure et supérieure de celle-ci, à l'aide d'une loupe binoculaire. La valeur moyenne obtenue est une approximation de l'écartement moyen de la fissure dans son ensemble, et sera nommée ouverture superficielle par la suite.

La mesure de la perméabilité à l'air des fissures permet d'établir la relation entre l'ouverture superficielle de la fissure et le débit d'air sortant, pour une pression entrante donnée. L'équation est de forme $y = ax^2 + bx$, où x est l'ouverture superficielle de la fissure (μm), et y est le débit d'air mesuré (L/min). Les coefficients a et b étant dépendants de la pression appliquée, leur valeur est différente à 0,2 et à 0,5 bar. Les coefficients a et b utilisés pour calculer les ouvertures apparentes des fissures sont donnés dans le Tableau 28. La Figure 107 présente les mesures de débit d'air des fissures étudiées au cours de ce projet en fonction de leur ouverture superficielle à 0,2 et 0,5 bar, ainsi que les courbes de tendance permettant de déterminer les coefficients a et b .

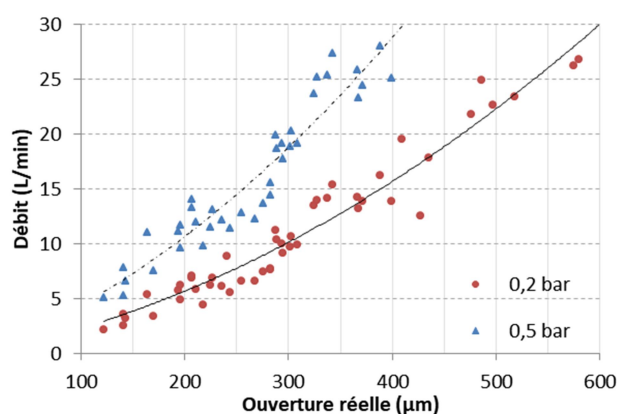


Figure 107 : Relation entre le débit d'air sortant et l'ouverture superficielle des fissures étudiées, à 0,2 et 0,5 bar.

Tableau 28 : Paramètres utilisés pour le calcul de l'ouverture apparente à 0,2 et 0,5 bar.

Pression entrante	a	b	Coefficient de détermination R^2
0,2 bar	$9,3505 \cdot 10^{-5}$	$3,4613 \cdot 10^{-2}$	0,901
0,5 bar	$5,3973 \cdot 10^{-5}$	$1,7595 \cdot 10^{-2}$	0,941

Le calcul de l'ouverture apparente des fissures à partir du débit d'air entrant permet de réaliser des mesures fiables au cours du processus de biocicatrisation. En effet, l'injection de milieu épaissi et le processus de biocicatrisation conduisent à la formation d'un dépôt d'épaisseur variable à l'intérieur et à la surface des fissures, qui rendent impossible la mesure de l'ouverture superficielle. La

mesure de l'ouverture apparente ne repose pas sur l'observation visuelle des fissures et permet donc de suivre le procédé de biocicatrisation de manière fiable quelle que soit la structure de la couche de biocicatrisation.

Le débit maximal pouvant être mesuré par l'appareil étant de 28 L/min, les mesures à 0,2 bar permettent d'étudier des fissures plus larges qu'à 0,5 bar. En outre, mesurer le débit à deux pressions différentes permet d'augmenter la précision de la mesure. Il peut y avoir des écarts importants entre ouverture superficielle et ouverture apparente lorsque les fissures ont une géométrie irrégulière (fissures ramifiées ou présentant une ouverture irrégulière à leur surface) : si cette différence est supérieure à 50 μm , la fissure n'est pas utilisée.

6.2.3. Préparation des essais de biocicatrisation

La préparation des essais de biocicatrisation comprend la préparation des enceintes de biocicatrisation ainsi que la préparation de l'inoculum bactérien.

Pour chaque éprouvette, un seau à couvercle de 28 cm de hauteur et 22 cm de diamètre est stérilisé par autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Ces seaux sont percés d'un orifice de 1 cm de diamètre sur le côté, comblé à l'aide d'un bouchon de mousse servant de filtre assurant les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur de l'enceinte sans en compromettre la stérilité. Ils contiennent en outre un support plastique de 3 cm de hauteur sur lesquelles sont disposées les éprouvettes. Après refroidissement, 1 L d'eau distillée stérile est ajouté dans chaque seau pour maintenir une atmosphère saturée en humidité dans les enceintes.

En parallèle, les éprouvettes sont préparées selon les étapes suivantes :

- L'ouverture latérale de la fissure est colmatée à l'aide d'adhésif, afin d'éviter les fuites et assurer le remplissage total de la fissure lors de l'injection. Cette opération est réalisée de la même manière que pour les essais d'injection réalisés lors de la caractérisation rhéologique du mélange Welan-Attagel ;
- Les éprouvettes sont stérilisées par immersion complète durant 12 h dans un bain d'éthanol à 70 %. Elles sont ensuite mises à sécher durant 24 heures sous hotte stérile.

L'inoculum bactérien est préparé en inoculant 100 mL de milieu NBN à 30°C avec un cryotube de *B. pseudofirmus*, sur un plateau rotatif à une vitesse de 150 rpm. Après 40 h de culture, un dénombrement par épifluorescence après coloration à l'acridine est réalisé et, si les bactéries sont sous forme de cocci avec une population comprise entre 5.10^9 et 1.10^{10} bactéries/mL, la culture est centrifugée à 4000 g durant 20 minutes à 20°C. Le surnageant est jeté et le culot est dispersé dans 100 mL de milieu d'injection (milieu LNGW).

6.2.3.1. Etude de l'impact de l'injection de milieu épaissi sur la perméabilité à l'air des fissures

L'injection de milieu LNGW implique l'introduction d'une grande quantité de matière solide et de composés solides dans la fissure, le milieu contenant 148 g/L de composés solubles et 60 g/L d'argile insoluble. Ces composés peuvent participer au colmatage de la fissure en formant des dépôts solides lors du séchage du milieu d'injection dans la fissure. Il est donc nécessaire, en plus de réaliser des échantillons témoins au cours des essais de biocicatrisation, de réaliser des essais d'injection préliminaires, afin de déterminer dans quelle mesure le milieu d'injection peut modifier la perméabilité à l'air des échantillons.

Dans ce but, six éprouvettes d'ouverture initiale comprise entre 200 et 350 μm ont subi une injection de milieu LNGW, puis ont été immédiatement mises à sécher à 40°C durant 48 heures pour mesurer la perméabilité à l'air des éprouvettes. L'opération est ensuite répétée jusqu'à ce qu'il ne soit plus possible d'injecter de milieu. A l'issue de cet essai, les mesures de perméabilité à l'air permettent d'obtenir une estimation de la réduction de l'ouverture apparente causée par l'injection de milieu épaissi à chaque injection, à l'aide des relations présentées dans le Tableau 28.

6.2.4. Conduite des essais de biocicatrisation

Pour biocicatriser les éprouvettes de mortier fissurées, celles-ci sont soumises à deux injections successives de milieu LNGW, puis régulièrement réapprovisionnées en nutriments par des injections périodiques de milieu LNG, durant 4 mois, dans des conditions d'hygrométrie, de stérilité et de température contrôlées. Trois séries d'échantillons sont réalisées (Tableau 29) : une série témoin, maintenue stérile durant toute la durée de l'essai, une série pour laquelle seules les injections de milieu LNGW sont réalisées avec du milieu contenant *B. pseudofirmus* (inoculation ponctuelle), et une série pour laquelle toutes les injections sont faites avec des bactéries (inoculation continue). Réinjecter des bactéries périodiquement permet de maintenir la population bactérienne à son maximum et ainsi de maximiser l'efficacité du traitement. Dans le cadre d'une utilisation réelle, renouveler les apports avec une culture bactérienne représente toutefois un surcoût important. Réinjecter du milieu stérile après les premières inoculations est une option moins onéreuse qu'une réinoculation systématique, avec le risque que ces injections puissent lessiver les bactéries présentes dans la fissure. Afin de ne pas provoquer de contamination biologique des échantillons, seule une observation visuelle est réalisée entre les réinjections.

Le déroulement complet de l'essai de biocicatrisation *in vitro* est récapitulé dans le Tableau 29. Sous hotte stérile, 10 mL de milieu LNGW sont injectés dans chaque fissure, stérile pour la série témoin, et contenant 1.10^{10} bactéries/mL pour les deux autres séries. Pour la série témoin, le milieu d'injection ainsi que l'eau de l'enceinte de biocicatrisation contiennent 0,1 g/L de Bronopol, un biocide permettant de limiter le développement de contaminants biologiques. Après l'injection, l'excédent de milieu restant à proximité directe de la fissure est laissé mais les éventuels écoulements sont essuyés à l'aide d'un tissu stérile. L'éprouvette est ensuite placée horizontalement sur le support adapté dans le seau. Le seau est placé dans une pièce thermostatée à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, et ouvert sous hotte stérile toutes les semaines pour une observation visuelle de l'état de l'échantillon (humidité, développement d'un biofilm, contaminations biologiques).

Après deux semaines, toutes les éprouvettes subissent une nouvelle injection identique à la première : 10 mL de milieu LNGW stérile sont injectés dans les éprouvettes témoins, 10 mL de milieu LNGW contenant 1.10^{10} bactéries/mL sont injectés dans les deux autres séries d'éprouvettes.

Après quatre semaines, deux éprouvettes inoculées sont sacrifiées pour analyse : la perméabilité à l'air est mesurée et les fissures sont observées à la loupe binoculaire et au MEB. L'essai est poursuivi pour les autres éprouvettes, qui sont réinoculées avec du milieu non épaissi : 10 mL de

milieu LNG stérile sont injectés dans chaque éprouvette fissurée pour la série témoin ainsi que pour la série à inoculation ponctuelle, tandis que 10 mL de milieu LNG contenant 1.10^{10} bactéries/mL sont injectés pour la série à inoculation continue. Ces injections sont répétées toutes les deux semaines jusqu'à la seizième semaine de traitement, pour un total de 8 injections en incluant les 2 injections réalisées à l'aide de milieu LNGW en début d'essai.

Tableau 29 : Etapes suivies lors des essais de biocicatrisation in vitro.

Chronologie	Etape	Série Témoin : 2 éprouvettes (T1 et T2)	Série à inoculation ponctuelle : 4 éprouvettes (P1 à P4)	Série à inoculation continue: 4 éprouvettes (C1 à C4)
Jour 0	Injection n°1 : milieu LNGW, 10 mL	Stérile	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL
2 ^{ème} semaine	Injection n°2 : Milieu LNGW, 10 mL	Stérile	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL
4 ^{ème} semaine	Contrôle de l'impact des premières injections	-	1 éprouvette sacrifiée (P1) : perméabilité et observations au MEB	1 éprouvette sacrifiée (C1) : perméabilité et observations au MEB
4 ^{ème} semaine puis toutes les 2 semaines	Injections n°3 à 8 : Milieu LNG, 10 mL	Stérile	Stérile	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL
16 ^{ème} semaine	Fin de l'essai : analyse des résultats	Toutes éprouvettes : perméabilité à 0,2 et 0,5 bar. T2 : MEB T1 : essai de pression et lessivage	Toutes éprouvettes : perméabilité à 0,2 et 0,5 bar. P2 : MEB P3, P4 : essai de pression et de lessivage	Toutes éprouvettes : perméabilité à 0,2 et 0,5 bar. C3 : MEB C2 : essai de pression et de lessivage

6.2.5. Analyse des essais de biocicatrisation

Suite à la mise en œuvre du traitement de biocicatrisation, les éprouvettes sont séchées à 40°C durant 48 h, puis la perméabilité à l'air des fissures est mesurée à 0,2 et 0,5 bar pour déterminer l'ouverture apparente des fissures et le taux de colmatage dû à leur biocicatrisation. Plusieurs échantillons ont été ensuite sacrifiés pour que des analyses soient réalisées :

- Observation de la fissure au MEB pour identifier les produits de cicatrisation au sein de la fissure, sur les surfaces internes brutes et sur les sections des fissures.
- Réalisation d'essais de résistance à la pression et au lessivage.

L'observation au MEB des fissures est réalisée sur les surfaces brutes et sur les sections polies des fissures, selon la méthode décrite dans la partie 4.2.4 traitant de la caractérisation de la microstructure du mélange Welan-Attagel.

Les éprouvettes n'ayant pas été découpées pour les observations au MEB sont soumises à un essai de résistance à la pression, puis à un essai de résistance au lessivage. Pour l'essai de résistance à la pression, les éprouvettes de mortier carbonatées sont placées dans un perméabilimètre de type CEMBURO capable de monter à de fortes pressions. Celle-ci fonctionne selon le même principe que la cellule utilisée pour les mesures de perméabilité à l'air, mais est dotée d'une structure renforcée et d'un boudin de confinement en caoutchouc épais. Après que l'éprouvette ait été mise en place dans la cellule, le boudin est gonflé à une pression de 6 bars, puis la pression entrante est progressivement augmentée jusqu'à 5 bars et maintenue durant 8 heures. La perméabilité à l'air des éprouvettes de mortier carbonatées est mesurée à 0,2 et 0,5 bar avec la cellule de perméabilité à l'air et la méthodologie présentée précédemment (Figure 106). L'impact de la pression sur le colmatage de la fissure est estimé par la différence de perméabilité à l'air entre les essais réalisés avant et après la mise sous pression.

L'éprouvette est ensuite soumise à un essai de résistance au lessivage : celle-ci est immergée dans l'eau distillée pendant 12 heures, puis une injection de 20 mL d'eau distillée dans la fissure est réalisée. L'éprouvette est ensuite séchée à 40°C durant 24 heures, puis la perméabilité à l'air de la fissure à 0,2 et 0,5 bar est mesurée. Lors de l'injection d'eau distillée, le flux sortant est récupéré et séché à 40°C dans un récipient taré afin de déterminer la masse de solides ayant été lessivés lors de

l'injection. L'effet de l'application d'une forte pression et l'effet du lessivage à l'eau sont estimés par la variation d'ouverture apparente observée suite à ces essais.

6.2.6. Conduite des essais en milieu extérieur

Les essais de biocicatrisation en milieu extérieur ont été préparés de manière similaire aux essais en conditions contrôlées :

- Huit éprouvettes de mortier ont été fissurées puis carbonatées, pour obtenir des fissures carbonatées d'ouverture comprise entre 150 et 450 μm .
- Une suspension de milieu LNG épaissi contenant 0,3 % de Welan et 6 % d'Attigel a été inoculée avec une préculture de *B. pseudofirmus* concentrée par centrifugation, pour une concentration bactérienne comprise entre 5.10^9 et 1.10^{10} bactéries/mL dans le milieu épaissi. 10 mL de suspension ont ensuite été injectés dans chacune des fissures. Sur les huit éprouvettes, quatre éprouvettes subissent une injection de milieu épaissi stérile, ces éprouvettes sont nommées « Ref ».
- Les éprouvettes ont été placées horizontalement sur des supports, dans des enceintes individuelles ajourées contenant 1 L d'eau chacune. Le site de l'essai est une zone découverte du centre de recherche des Mines de Douai, exposée au soleil (étant dans les enceintes, les éprouvettes ne sont pas directement exposées au soleil), au vent et aux intempéries. L'essai est réalisé du 8 avril au 8 septembre 2017.
- Après 7 jours puis toutes les deux semaines, la perméabilité à l'air des fissures est mesurée, puis 10 mL de milieu LNG non épaissi contenant entre 5.10^9 et 1.10^{10} bactéries/mL sont injectés. Ces injections ont pour but de maximiser l'apport en nutriments et surtout en calcium dans les fissures. En effet, nous avons calculé au cours de l'étude bibliographique (voir partie 1.3.5.1) que la concentration du milieu en ions calcium est insuffisante pour assurer un colmatage complet, un apport renouvelé est donc nécessaire. Pour les quatre échantillons « Ref », du milieu LNG stérile est injecté. Après 9 semaines de traitement, les mesures de perméabilité à l'air sont espacées, afin de maintenir les fissures mouillées le plus longtemps possible. Les mesures de perméabilité sont donc réalisées après 13 puis 21 semaines de traitement (fin de l'essai). Les réinjections de milieu LNG sont toujours réalisées toutes les deux semaines.

- Au bout de 21 semaines, l'essai est stoppé pour analyse des résultats. La perméabilité à l'air est mesurée pour toutes les éprouvettes. Une éprouvette « Ref » et une éprouvette inoculée sont sacrifiées pour réaliser l'observation au MEB de la surface interne des fissures, tandis que les autres éprouvettes sont soumises aux tests de résistance à la pression et au lessivage.

Tableau 30 : Etapes suivies lors des essais de biocicatrisation in situ.

Chronologie	Etape	Référence : 4 éprouvettes (Ref-1 à Ref-4)	Série inoculée : 4 éprouvettes (Inoc-1 à Inoc-4)
Jour 0	Injection n°1 : milieu LNGW, 10 mL	Non inoculé	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL
1 ^{ère} , 3 ^{ème} , 5 ^{ème} , 7 ^{ème} , 9 ^{ème} et 13 ^{ème} semaine	Injections n°2 à 6 : Milieu LNG, 10 mL	Non inoculé	Inoculé 1.10^{10} bactéries/mL
21 ^{ème} semaine	Fin de l'essai : analyse des résultats	Toutes éprouvettes : perméabilité à 0,2 et 0,5 bar. Ref-2 : MEB Ref-1, Ref-3, Ref-4 : essai de pression et de lessivage.	Toutes éprouvettes : perméabilité à 0,2, 0,5 bar. Inoc-2 : MEB Inoc-1, Inoc-3, Inoc-4 : essai de pression et de lessivage.

6.3. Résultats et interprétation

6.3.1. Impact du milieu épaissi sur la perméabilité à l'air des fissures

Le Tableau 31 présente l'évolution de l'ouverture apparente (OA) moyenne pour les six éprouvettes étudiées, et la Figure 108 représente les réductions d'ouverture apparente suivant chaque injection pour chacune des six éprouvettes étudiées.

L'injection de milieu LNGW se traduit par une baisse de la perméabilité de $68\ \mu\text{m}$ ($\pm 32\ \mu\text{m}$) à chaque injection en moyenne, pour une ouverture apparente (OA) initiale moyenne de $277\ \mu\text{m}$ ($\pm 51\ \mu\text{m}$). Cette réduction est toutefois variable en fonction de l'échantillon considéré et du nombre d'injections déjà réalisées : la réduction d'ouverture moyenne est de $68\ \mu\text{m}$ ($\pm 26\ \mu\text{m}$) après la première injection, puis de $39\ \mu\text{m}$ ($\pm 31\ \mu\text{m}$) et $97\ \mu\text{m}$ ($\pm 42\ \mu\text{m}$) lors des deux injections suivantes. La plus faible réduction d'ouverture apparente suivant une injection ayant été mesurée est de $10\ \mu\text{m}$, tandis que la plus élevée est de $136\ \mu\text{m}$, il y a donc une forte variabilité de la réduction de perméabilité à l'air à chaque injection. Après trois cycles d'injection de milieu LNGW, l'ouverture apparente des fissures est réduite à $74\ \mu\text{m}$ ($\pm 42\ \mu\text{m}$) et il est impossible de réaliser des injections supplémentaires, la résistance à l'écoulement étant devenue trop importante.

Tableau 31 : Impact de l'injection de la suspension LNGW sur l'ouverture apparente (OA) de mortiers fissurés.

Echantillon	OA initiale (μm)	OA après 1 injection (μm)	Réduction d'OA (μm)	OA après 2 injections (μm)	Réduction d'OA (μm)	Réduction d'OA cumulée (μm)	Taux de colmatage (%)
1	215	159	56	127	32	88	41
2	226	166	60	111	54	114	51
3	279	185	95	174	10	105	38
4	284	225	59	183	42	101	36
5	308	227	81	191	36	117	38
6	352	294	58	235	58	117	33
Moyenne	277	209	68	170	39	107	40
Ecart-type	41	44	15	40	17	7	6

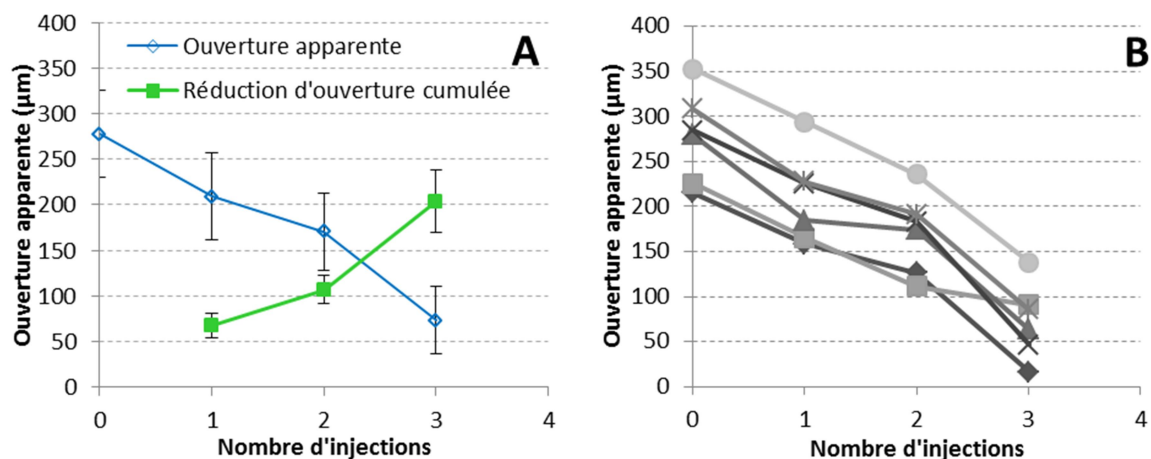


Figure 108 : Réduction d'ouverture apparente après chaque injection de milieu LNGW.A – données moyennes pour 6 échantillons ; B – mesures individuelles des échantillons.

Ces résultats montrent que l'injection de milieu épaissi se traduit par une réduction significative de perméabilité à l'air des fissures et donc de leur ouverture apparente. Il a pu être constaté lors de la caractérisation du mélange Welan-Attagel que le dépôt forme une croûte mince dans la fissure, mais parcourue de crêtes formées par la rétractation du milieu lors de son séchage. Ces crêtes forment autant de barrières à la circulation de l'air au sein de la fissure et permettent de réduire la perméabilité de celle-ci malgré le faible volume de solide déposé. On remarque en outre que la réduction de perméabilité provoquée par une injection peut varier en fonction de l'échantillon considéré. La nature hétérogène du réseau de crêtes formé au sein des fissures, ainsi que les différences entre les fissures elles-mêmes, peuvent être responsables des différences observées. A l'aide de ces mesures, l'impact du milieu épaissi sur la perméabilité des échantillons en l'absence de bactéries est connu, ce qui permettra lors des essais de biocicatrisation de différencier plus efficacement le rôle des bactéries et du milieu d'injection dans la réduction de perméabilité des fissures.

6.3.2. Biocicatrisation après 4 semaines de traitement

Après quatre semaines de traitement (soit deux injections de milieu LNGW inoculé), deux éprouvettes de mortier sont sacrifiées pour subir une mesure de perméabilité à l'air à 0,2 et 0,5 bar et être observées à la loupe binoculaire et au MEB. Pour la première éprouvette (P1), la diminution de l'ouverture apparente de la fissure est de 187 μm pour une ouverture initiale de 223 μm, soit un taux

de colmatage de 84 %. Pour la seconde éprouvette (C1) ayant une fissure d'ouverture initiale égale à 239 μm , la diminution de l'ouverture apparente est de 157 μm , soit un taux de colmatage de 66 %. Or, les mesures réalisées sur des échantillons non inoculés indiquent que deux injections de milieu épaissi peuvent réduire l'ouverture apparente d'en moyenne 107 μm (+/- 7 μm) pour une valeur initiale de 277 μm (+/- 41 μm), soit un taux de colmatage de 40 % (Tableau 31). Il y a donc eu une réduction de perméabilité à l'air significativement plus importante pour les échantillons inoculés que pour les échantillons témoins.

On observe toutefois que la surface du mortier est légèrement humide mais non détrempée pour les deux échantillons, avec peu voire pas de biofilm formé au niveau de la fissure. Le dépôt de milieu d'injection est d'apparence sèche sauf à certains points, zones où le milieu est accumulé en grosses gouttes qui sont quant à elles restées liquides. Malgré l'humidité ambiante, la fissure est donc globalement sèche.

Tableau 32 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 4 semaines de traitement pour des mortiers fissurés inoculés ponctuellement (série P) ou en continu (série C).

Echantillon	OA initiale (μm)	OA finale (μm)	Réduction d'OA (μm)	Taux de colmatage (%)
P1	223	37	186	83
C1	239	82	157	66

Sur les surfaces internes brutes observées au MEB (Figure 109), on observe en surface comme en profondeur une couche de dépôt ayant la même apparence que celle observée lors de la caractérisation abiotique du mélange Attagel (voir chapitre 4), composée d'un tapis d'aiguilles entrelacées d'environ 0,5 μm de largeur sur 5 μm de longueur, parsemé de particules diverses (amas irréguliers de 2 à 5 μm de diamètre, rhomboédres de 5 à 10 μm de côté et blocs irréguliers lisses semblables à des tessons de verre, correspondant respectivement à des précipités, de la dolomite et à des débris de sable). On observe toutefois que les échantillons ayant été inoculés avec *B. pseudofirmus* présentent deux types d'objets, qui n'ont pas été observés lors de la caractérisation du mélange Welan-Attagel :

- Des formes sphériques ou ovoïdes lisses de diamètre compris entre 1 et 1,5 μm (Figure 109), souvent regroupées en petits amas. Ces objets diffèrent des précipités par leur

régularité et leur aspect lisse, et sont de dimensions égales aux bactéries observées par microscopie à épifluorescence. Il s'agit très vraisemblablement de *B. pseudofirmus*.

- Des amas sphériques de 5 à 10 μm de diamètre, composés de cristaux de moins de 1 μm (Figure 110). Rares, ces objets ressemblent aux amas de précipités présents dans les échantillons stériles, mais s'en distinguent par leur forme sphérique régulière. Ces objets sont semblables aux sphérulites de carbonate de calcium résultant du processus de biominéralisation observés par Dade-Robertson *et al.* (2014) [87], et peuvent donc être le résultat de la biominéralisation par *B. pseudofirmus*.

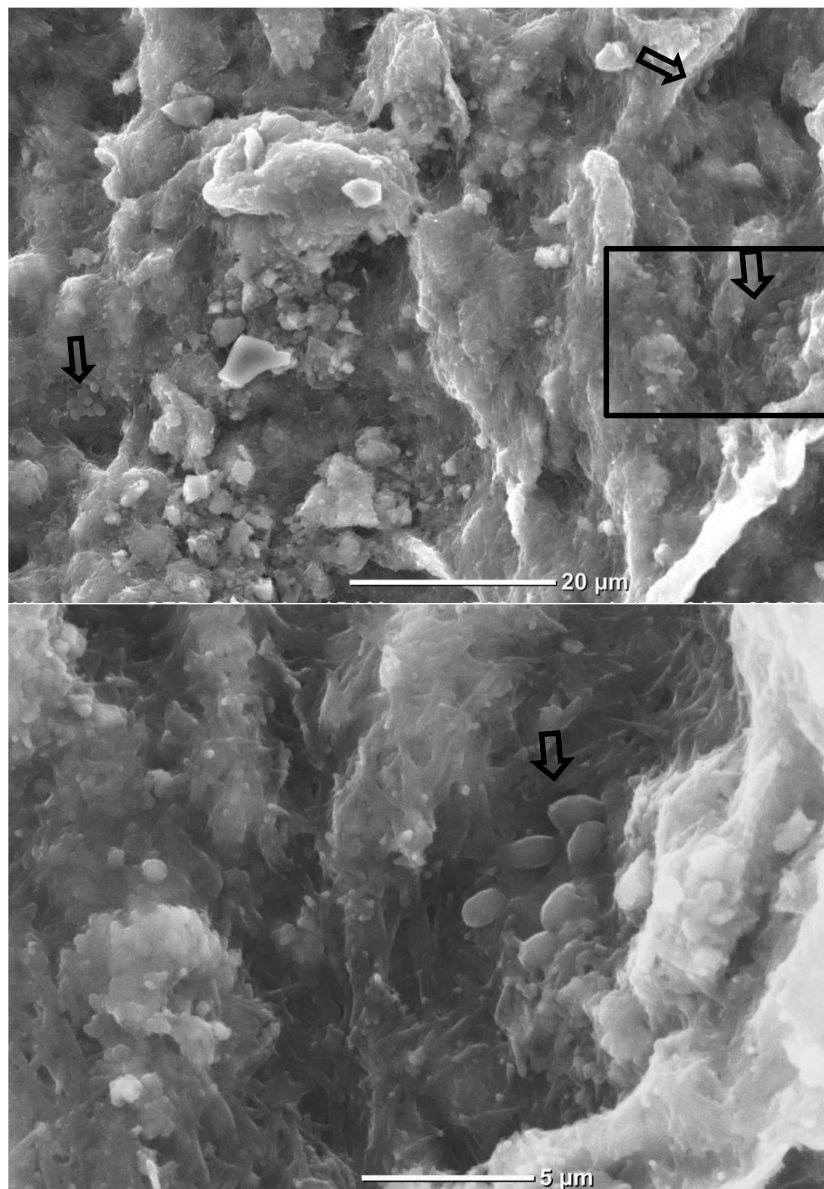


Figure 109 : Observation au MEB du dépôt d'injection après 1 mois de traitement *in vitro* en présence de bactéries, échantillon P1. Flèches : bactéries.

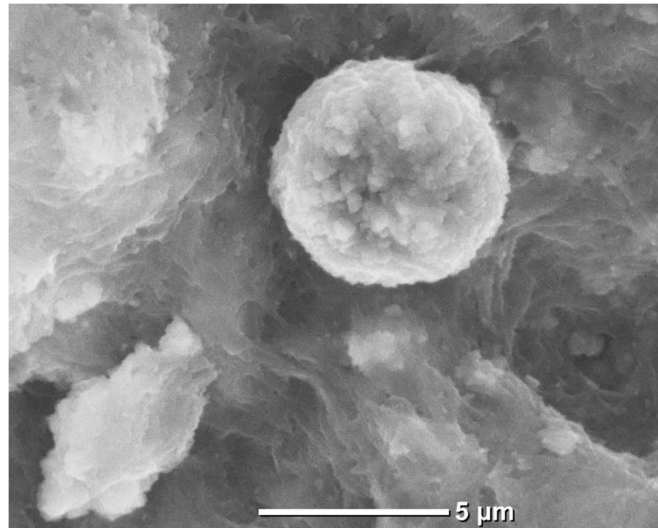


Figure 110 : Observation au MEB du dépôt d'injection de l'échantillon P1 après 1 mois de traitement *in vitro* en présence de bactéries, ciblant un sphérulite.

L'observation au MEB (Figure 111) et l'analyse par EDS (Figure 112) des sections polies de la fissure montre que les surfaces internes sont recouvertes d'une fine couche de milieu d'injection séché d'épaisseur comprise entre 5 et 50 μm , formant des crêtes éparses créant partiellement ou totalement des ponts entre les deux parois de la fissure. La composition atomique (en pourcentage atomique) des différentes inclusions présentes à la surface de la fissure et dans la crête permet de déterminer leur nature :

- Point 1. La zone ciblée est une couche située en surface du mortier, composée de 32 % atomique de calcium et de 68 % d'oxygène. La composition correspond à celle du carbonate de calcium. Sa localisation à la surface du mortier suggère qu'il s'agit de la couche d'autocicatrisation naturelle du matériau formée durant la carbonatation des éprouvettes.
- Les points 2, 3 et 5. Les points de mesure ciblent différents points de la crête de dépôt, sans comprendre d'inclusions. Les trois points ont des compositions similaires, avec des concentrations élevées en silicium, en aluminium et en magnésium. Ces concentrations témoignent de la présence d'Attagel, qui contient ces éléments à hauteur d'environ 30 %, 7 % et 7 %, respectivement. On n'observe pas de variation importante de la composition du dépôt entre les différents points. Il ne semble donc pas y avoir eu d'accumulation de carbonate de calcium au sein du dépôt d'injection, ni de lessivage de ses éléments constituants.

- Le point 4. La zone cible une impureté à la surface du dépôt d'injection. L'inclusion est essentiellement composée de silicium (70 %) et d'oxygène (30 %) : il s'agit probablement d'un débris de sable (quartz) emporté lors de l'injection.
- Le point 6. La zone cible une inclusion à l'intérieur du dépôt d'injection. Riche en calcium, silicium et oxygène (23 % Ca, 16 % Si, 53 % O), cette inclusion est probablement un débris de ciment hydraté emporté lors de l'injection.
- Le point 7. La zone cible un cristal rhomboédrique de 5 à 10 µm de côté. Le cristal est essentiellement composé d'oxygène (64 %), mais contient du silicium (15 %), du magnésium (9 %) et du calcium (8 %) en quantités non négligeables. Malgré la présence de silicium, la composition et la morphologie du cristal correspondent à celle de la dolomite ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), une impureté présente dans l'Attigel observée lors de la caractérisation de la microstructure du milieu d'injection épaissi. La présence de silicium peut être expliquée par des interférences provenant des composés environnants, le cristal étant de petite taille.

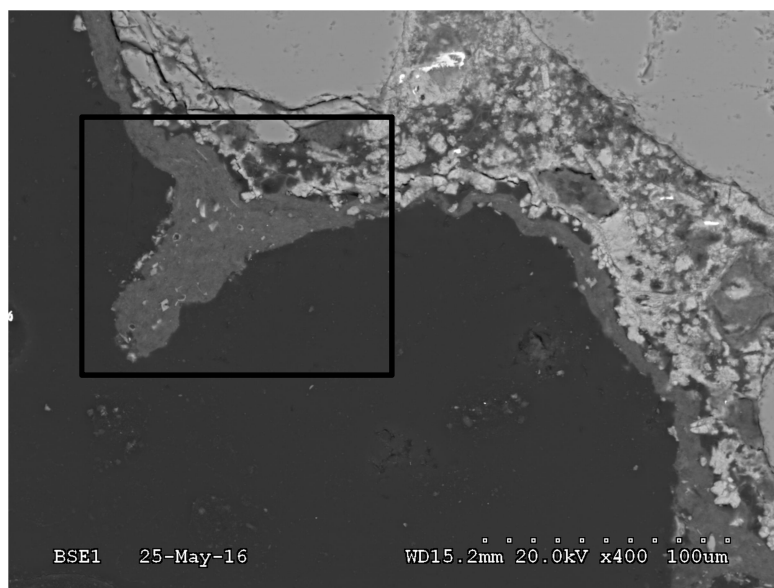


Figure 111 : Observation au MEB de la section polie de l'échantillon P1 après 4 semaines de biocicatrisation *in vitro*. Carré : zone sélectionnée pour la conduite d'analyses EDS.

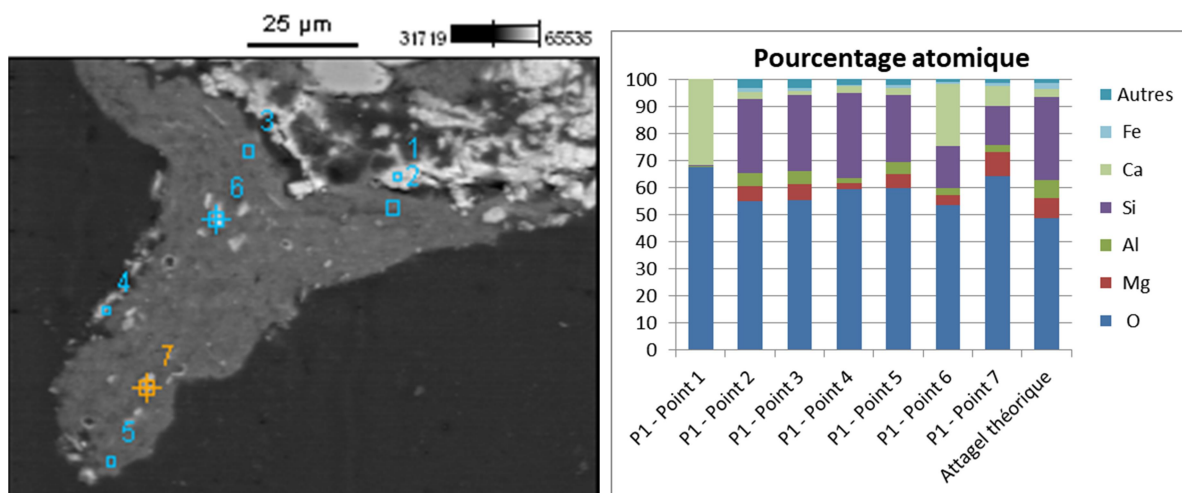


Figure 112 : Analyses EDS de différents points d'une crête de dépôt d'injection, échantillon P1 après quatre semaines de biocicatrisation *in vitro*.

Bien que des dépôts de carbonate de calcium puissent être observés à la surface du mortier lui-même, aucune accumulation importante de carbonate de calcium n'a pu être observée à la surface ou à l'intérieur du dépôt d'injection, et il n'est pas possible de déterminer si les inclusions de carbonate de calcium dans le dépôt proviennent de la couche d'autocicatrisation naturelle ayant été entraînées par l'injection ou si elles sont issues d'une activité de biominéralisation. Cette observation confirme qu'un traitement de 4 semaines est insuffisant pour permettre la biogénèse de quantités importantes de CaCO_3 dans les fissures : le traitement doit par conséquent être prolongé.

6.3.2.1. Conclusion

Les échantillons ayant subi un traitement de quatre semaines (soit deux injections de milieu LNGW inoculé) de biocicatrisation *in vitro* présentent les caractéristiques suivantes :

- Une réduction de l'ordre de 170 μm de l'ouverture apparente avec un taux de colmatage de l'ordre de 75 %. La comparaison des résultats obtenus avec ceux de témoins abiotiques montre que le taux de colmatage des échantillons inoculés est significativement supérieur à celui des échantillons témoins abiotiques, pour lesquels la réduction de perméabilité à l'air est de l'ordre de 100 μm et le taux de colmatage d'environ 40 % après deux injections de milieu épaissi. Le dépôt d'injection observé sur les surfaces brutes et les sections polies est similaire en composition et en apparence au dépôt d'injection observé pour des

échantillons ayant des injections de milieu épaissi non suivies d'un traitement de biocicatrisation. Il est en effet principalement composé d'Attagel, qui forme un tapis d'aiguilles à la surface du matériau et s'accumule en crêtes irrégulières dans la fissure.

- Il est possible d'observer de nombreux amas de bactéries répartis au sein de la fissure, ainsi que de rares sphérulites pouvant être le résultat de la biominéralisation de carbonate de calcium par *B. pseudofirmus*. Ces amas sont cependant trop rares et de trop petite taille pour être observables sur les sections polies des fissures.

La forte réduction de perméabilité à l'air mesurée au sein des fissures suggère qu'une couche de biocicatrisation a été formée au sein des fissures, mais l'absence d'une couche de biocicatrisation visible montre qu'il n'y a pas eu une précipitation importante de carbonate de calcium au sein de la fissure, malgré des traces de croissance bactérienne et de biominéralisation. Il est possible que le fort taux de colmatage mesuré résulte de la combinaison entre un dépôt d'Attagel supérieur à la moyenne et la production de carbonate de calcium par les bactéries, mais les observations réalisées ne permettent pas de déterminer les contributions respectives de ces facteurs au colmatage des fissures.

Deux injections de milieu LNGW inoculé sur une période de 4 semaines ne sont donc pas suffisantes pour permettre la précipitation de quantités suffisantes de CaCO_3 par les bactéries pour réaliser un colmatage significatif des fissures. Toutefois, la présence de bactéries et de sphérulites de calcite témoignent que le processus de biocicatrisation a débuté.

6.3.3. Biocicatrisation après 16 semaines de traitement

Après les deux injections de milieu épaissi inoculé réalisées sur les mortiers fissurés, du milieu LNG non épaissi y est injecté toutes les 2 semaines durant 12 semaines afin de renouveler les nutriments et l'eau dans les fissures. Pour vérifier la nécessité de réintroduire périodiquement des bactéries dans les fissures, une partie des éprouvettes de mortier est réapprovisionnée avec du milieu LNG contenant des bactéries, tandis que l'autre partie des éprouvettes de mortier est réapprovisionnée avec du milieu LNG stérile. Une biocicatrisation importante des éprouvettes ayant reçu un approvisionnement stérile permettrait en effet de vérifier s'il est possible de s'affranchir d'une réinjection périodique de bactéries pour réaliser la biocicatrisation, et ainsi de limiter les coûts de mise en oeuvre. Les ouvertures apparentes des échantillons sont présentées dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 16 semaines de traitement pour des mortiers fissurés témoins (série T), inoculés ponctuellement (série P) ou en continu (série C).

Echantillon	OA initiale (μm)	OA finale (μm)	Réduction d'OA (μm)	Taux de colmatage (%)
T1	197	46	151	77
T2	248	72	176	71
P2	216	40	176	81
P3	298	44	254	85
P4	231	49	182	79
C2	224	53	171	76
C3	235	39	196	83
C4	298	35	263	88

Durant l'ensemble des seize semaines de traitement, les échantillons témoins ne présentent pas de développement microbien, et l'apparence du dépôt d'injection en surface n'a pas évolué (Figure 113). Le dépôt de surface s'apparente en effet à une croûte d'argile sèche adhérant fortement au support malgré un léger écaillage de surface. Bien que la fissure puisse être colmatée par endroits par des ponts de dépôt d'injection sec, la fissure elle-même reste ouverte et visible.



Figure 113 : Surface de l'échantillon T2 (témoin stérile), après 16 semaines de traitement.

Après 16 semaines de traitement, l'ouverture apparente du témoin T1 est de 46 μm , pour une ouverture initiale de 197 μm , ce qui correspond à une réduction d'ouverture apparente de 151 μm . Pour le témoin T2, la réduction d'ouverture apparente est de 176 μm pour une ouverture initiale de

248 μm . Observée au MEB, la surface interne de la fissure témoin (Figure 114) est recouverte d'un tapis d'aiguilles entrelacées recouvert de précipités de tailles et de formes variables. Ce dépôt est similaire à celui observé lors des précédentes injections de mélange Welan-Attigel en l'absence de bactéries. Les précipités se présentent sous la forme d'amas irréguliers de particules de taille inférieure à 1 μm , un aspect similaire à celui des précipités observés lors de la caractérisation du mélange Welan-Attigel. On note toutefois qu'ils sont particulièrement abondants dans les fissures étudiées au cours de cet essai. Pour les échantillons ayant subi plusieurs injections successives de milieu, les fissures contiennent plus de composés solubles susceptibles de former des précipités lors du séchage, ce qui expliquerait leur abondance à la surface des fissures observées au MEB.

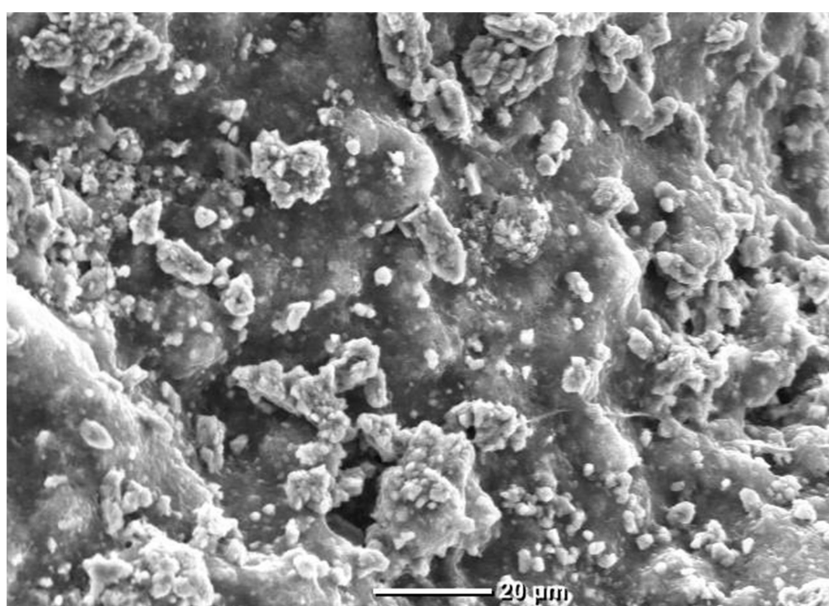


Figure 114 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein de l'échantillon T2 après 4 mois de traitement *in vitro*.

L'observation au MEB d'une section polie de la fissure révèle que le dépôt a une structure identique à celle observée lors de la caractérisation du mélange Welan-Attigel, formant un film parcouru de crêtes dans la fissure, apparaissant au MEB comme une couche grise sombre détachée du mortier par endroits (Figure 115). L'analyse EDS de ces échantillons montre que le dépôt est formé d'un mélange ayant la composition indiquée dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Analyse par EDS du dépôt d'injection au sein de l'échantillon T2 après 16 semaines de traitement *in vitro*.

Elément	O	Mg	Al	Si	Ca	Fe
% atomique mesuré par EDS	52,7 (+/- 4,4)	6,2 (+/- 0,5)	5,2 (+/- 0,4)	29,3 (+/- 3,0)	2,3 (+/- 1,3)	1,3 (+/- 0,2)
% atomique théorique dans l'Attigel	48,8	7,4	6,7	30,5	2,8	2,4

Cette composition correspond bien à celle du dépôt de milieu épaissi, avec des teneurs en magnésium, en aluminium, en silicium et en fer, proches de la composition théorique de l'Attigel. Le dépôt d'injection est essentiellement constitué d'argile, et présente des inclusions de ciment hydraté, de sable, de dolomite et de carbonate de calcium. Le carbonate de calcium observé est situé à la surface du mortier ou dispersé en particules de moins de 20 µm dans le dépôt d'injection. Il s'agit donc probablement de carbonate de calcium issu du processus d'autocicatrisation abiotique, antérieur à l'injection, qui s'est formé à la surface du mortier et dont des débris ont été entraînés dans le milieu épaissi lors de l'injection.

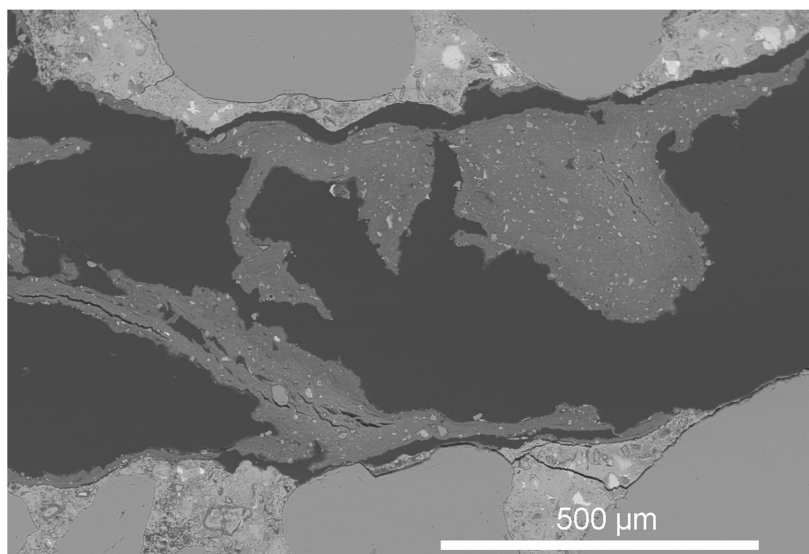


Figure 115 : Observation au MEB de la section polie de l'échantillon T2 après 4 mois de traitement *in vitro*.

Dans le cas des échantillons inoculés, les résultats de perméabilité à l'air ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les échantillons ayant subi des injections avec le milieu LNG stérile et ceux ayant subi des injections avec le milieu LNG inoculé périodiquement compte tenu de la variabilité des essais. En effet, pour les échantillons ayant étéensemencés avec *B. pseudofirmus* uniquement lors des injections de milieu épaissi (P2, P3, P4) le traitement a permis de réduire

l'ouverture apparente de 176, 254 et 182 μm respectivement alors que les réductions apparentes des fissures sont de 171, 196 et 263 μm pour les échantillons C2, C3 et C4, qui ont étéensemencés régulièrement sur toute la durée de l'essai (Figure 116). Toutefois, si on compare les échantillons P4 et C3 d'ouverture initiale proche (231 et 235 μm respectivement), l'ouverture apparente de la fissure de l'échantillon P4 après 16 semaines est de 49 μm contre 39 μm pour l'échantillon C3, soit une réduction apparente de 182 et 196 μm respectivement. Il en est de même pour les échantillons P3 et C4 dont l'ouverture initiale est de 298 μm et pour lesquels la réduction de l'ouverture apparente est de 254 et 263 μm respectivement.

Il semble donc il y avoir une réduction d'ouverture très légèrement plus importante dans les échantillons inoculés en continu que dans les échantillons inoculés ponctuellement. Il n'est donc pas nécessaire de réaliser des inoculations bactériennes répétées pour réaliser le traitement en conditions optimales.

Pour les échantillons P4 et C3, la réduction de l'ouverture apparente est du même ordre de grandeur que celle du témoin T2 ayant une ouverture apparente initiale proche : 182 et 196 μm contre 176 μm . En revanche, pour les fissures plus larges comme celle des échantillons P3 et C4 (298 μm), la réduction de l'ouverture apparente est significativement plus élevée que celle des témoins, égale à 182, 263 μm contre 176 μm . Deux facteurs peuvent être à l'origine de cette différence. D'une part, le volume interne de la fissure est plus élevé et permet l'introduction d'une plus grande quantité de milieu, ce qui peut se traduire par la formation d'un dépôt d'injection plus épais et par une plus grande quantité de bactéries et de nutriments disponibles pour la biocicatrisation. D'autre part, il se peut que la largeur plus importante de la fissure favorise l'activité bactérienne en facilitant la circulation des gaz et nutriments dans la fissure. Les échantillons inoculés ont une ouverture apparente finale qui ne peut descendre en dessous d'une valeur de 35 μm , il est donc possible qu'il s'agisse d'une valeur minimale en deçà de laquelle il est impossible de descendre.

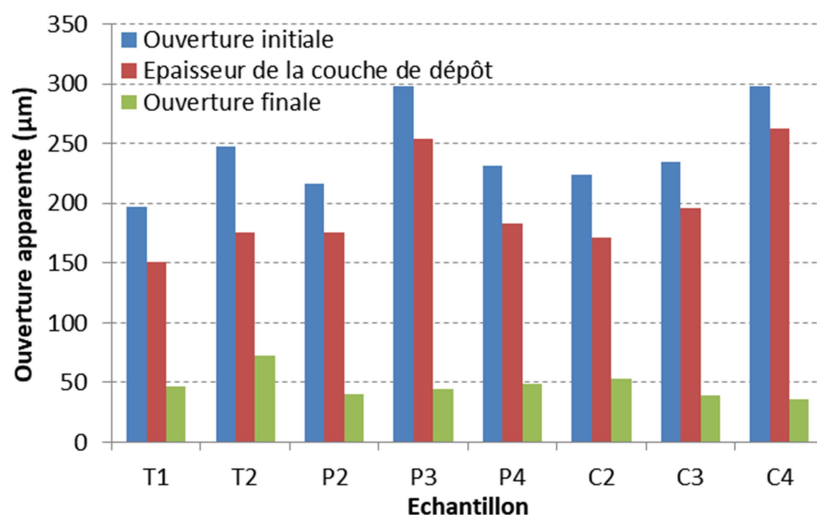


Figure 116 : Réduction des ouvertures apparentes des séries témoin et inoculées, après 4 mois de traitement.

Les tests de résistance au vieillissement ont pour objectif d'étudier la résistance de la couche de colmatage à de fortes pressions et aux précipitations. Le test de résistance au lessivage en particulier permet de supprimer le colmatage apporté par les composés solubles précipités au sein des fissures en les entraînant hors de la fissure. Les ouvertures apparentes (OA) des fissures à la fin du traitement puis suite aux tests de résistance à la pression et au lessivage sont présentées sur la Figure 117. On constate que les fissures présentent des réponses différentes aux tests, mais plusieurs tendances peuvent être observées :

- La résistance à la pression ou au lessivage varie fortement, et aucune tendance ne peut être distinguée entre les échantillons témoins, inoculés ponctuellement ou inoculés en continu. La présence ou non de bactéries ne semble donc pas avoir d'impact sur la résistance au vieillissement du dépôt d'injection.
- Les fortes pressions ont un impact limité sur l'OA des fissures étudiées, et ont tendance à réduire l'OA des fissures. En effet, quelle que soit la fissure, l'OA ne varie pas de plus de 20 µm suite au test. Sur les échantillons étudiés, l'application d'une forte pression diminue fortement l'OA de T1 et P4, tandis que les autres sont peu impactés par le test, l'OA étant augmentée de moins de 8 µm. C'est une observation cohérente, étant donné que les composés détachés de la paroi des fissures par la pression peuvent être bloqués à l'intérieur de la fissure formant un bouchon par accumulation.

- Le test de lessivage augmente généralement l'OA des fissures, jusqu'à un maximum de 36 μm . Cette augmentation de l'OA des fissures peut s'expliquer par le lessivage de précipités solubles dans la fissure, en particulier des nutriments présents dans le milieu LNG qui n'auraient pas été consommés. Le dépôt d'injection semble toutefois résistant au lessivage, puisque seulement deux échantillons sur les cinq étudiés sont sensibles au lessivage.

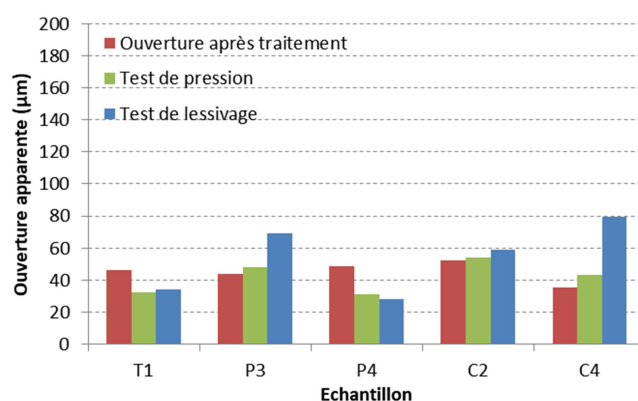


Figure 117 : Ouverture apparente des éprouvettes à la fin du traitement de biocicatrisation, puis après les tests de résistance à la pression et au lessivage.

Pour les éprouvettes ayant été inoculées de manière ponctuelle aussi bien que pour celles inoculées en continu, on observe le développement d'un film de couleur saumon à l'embouchure des fissures et sur la surface externe jusqu'à 1 cm de distance de la fissure (Figure 118). Ce film est plus épais sur la fissure elle-même, formant une cicatrice. On observe entre les différentes fissures des différences d'humidité, certaines étant détrempées et d'autres seulement humides, bien que l'atmosphère des enceintes ait été constamment maintenue à 100 % d'humidité relative.

L'épaisseur du biofilm produit est plus importante pour les éprouvettes les plus humides, et relativement réduite pour les éprouvettes les plus sèches. En plus d'avoir la même efficacité de colmatage des fissures, les inoculations ponctuelle et continue se traduisent toutes deux par un développement de biofilm équivalent à la fin de l'essai. Une inoculation ponctuelle est donc suffisante pour assurer la croissance des bactéries lors du traitement de biocicatrisation, et des inoculations multiples ne sont pas requises.



Figure 118 : Photographie de la surface supérieure de l'échantillon P3, après 4 mois de traitement.

Les surfaces brutes des échantillons inoculés en continu et des échantillons inoculés ponctuellement, observées au MEB, ont la même apparence et présentent les mêmes éléments. Les observations réalisées révèlent une couche de dépôt où trois principaux éléments peuvent être identifiés :

- Le tapis d'Attigel lui-même, dont l'apparence est identique à celle décrite lors de la caractérisation du mélange Welan-Attigel. Il s'agit d'un tapis d'aiguilles entrelacées d'environ 5 μm de longueur couvrant la surface du matériau, et comprenant des particules dont des rhomboèdres de dolomite, et des amas informes de nutriments et/ou précurseurs de biominéralisation précipités lors du séchage. Ces échantillons diffèrent toutefois légèrement des essais abiotiques, car ce tapis est par endroits rendu flou par un fin film translucide (Figure 119). Il s'agit probablement d'une couche de biofilm bactérien formé par-dessus le dépôt d'injection.
- Les bactéries, formes ovoïdes lisses d'une longueur d'environ 1,5 μm pour une section d'environ 1 μm (Figure 119). Ces bactéries sont plus grosses, plus isolées et plus proches de la forme bacille que celles observées après seulement 1 mois de traitement, qui ressemblaient davantage aux amas de cocci observés au microscope lors de la réalisation des précultures.
- Des amas de 5 à 20 μm , formés de cristaux rhomboédriques plats de taille inférieure à 1 μm . Ces amas peuvent se présenter sous la forme de piliers (Figure 119), de blocs (Figure 120) ou de sphérulites (Figure 121), et sont partiellement enchâssés dans le tapis d'Attigel. En certains endroits, ces amas sont percés d'orifices ronds de 1,2 à 1,5 μm de

diamètre. Ces amas ne couvrent pas l'intégralité de la surface observée, mais semblent répartis au sein de celle-ci et présents aussi bien à proximité de la surface qu'à 1 cm de profondeur.

Les bactéries, présentes ici sous forme de bacilles isolées, sont reconnaissables par leur morphologie, leurs dimensions et leur aspect lisse. Bien qu'elles aient été initialement injectées dans la fissure sous forme de cocci, les essais de croissance bactérienne en milieu épaissi ont révélé que leur morphologie peut évoluer vers la forme bacille au cours du temps. Il y a donc une abondance de bactéries dans les fissures, non seulement pour les échantillons ayant étéensemencés périodiquement mais aussi pour les échantillons ayant étéensemencés seulement en début d'essai et ayant subi des réinjections de milieu LNG stérile par la suite.

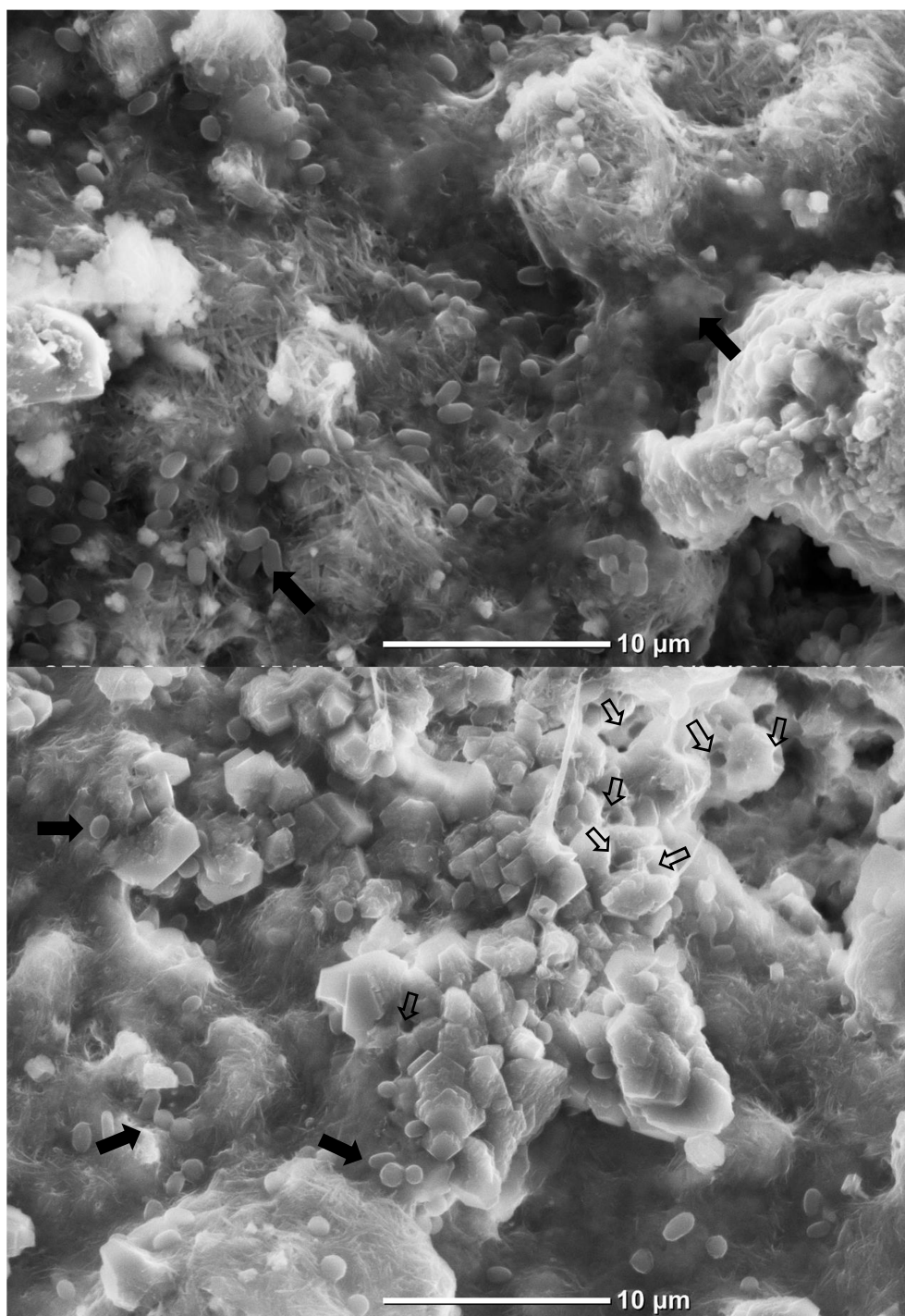


Figure 119 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon P2 après 4 mois de traitement in vitro.

Flèches pleines : bactéries et biofilm – flèches creuses : empreintes bactériennes dans le CaCO_3 .

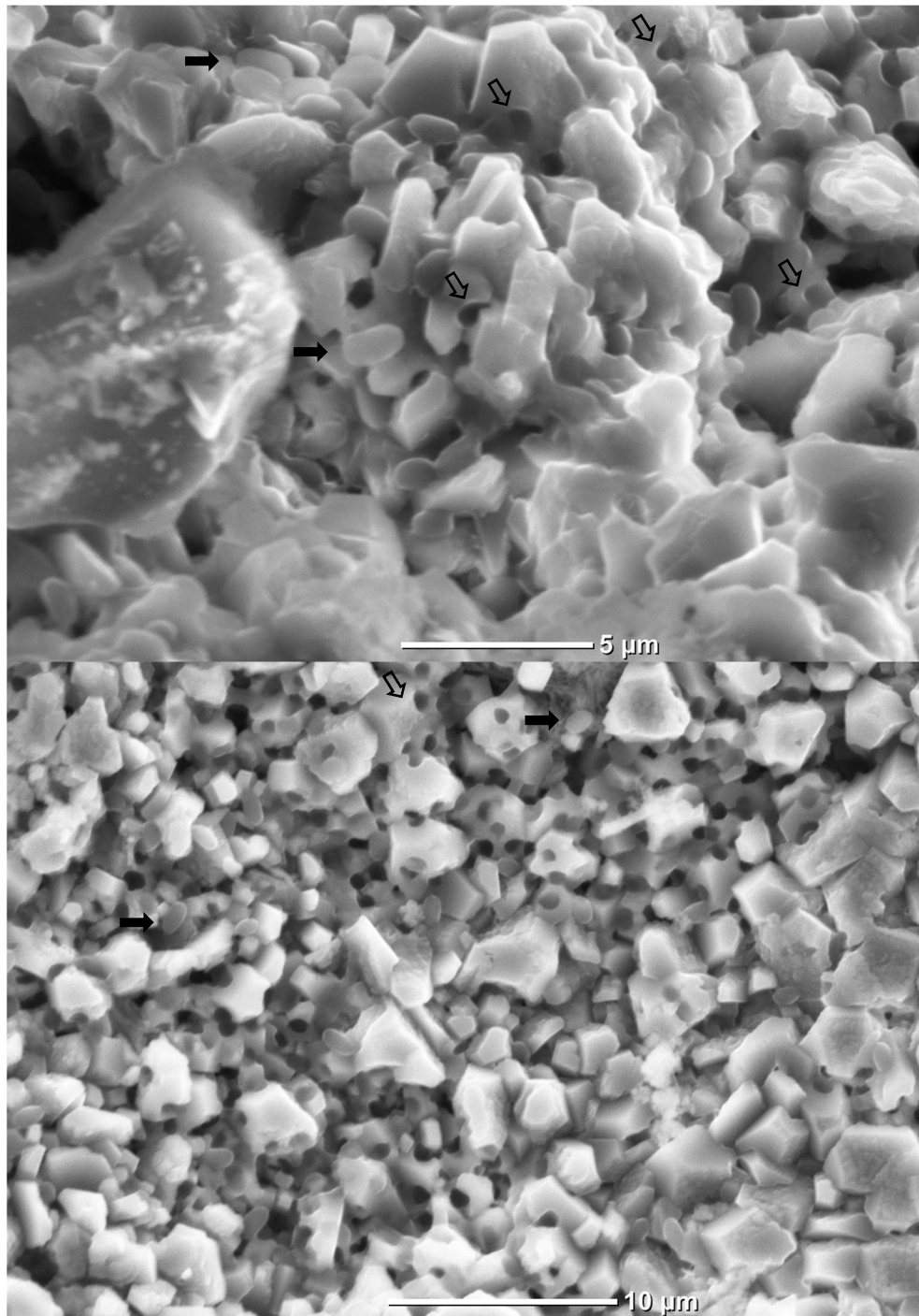


Figure 120 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon C3, après 4 mois de traitement in vitro. Flèches pleines : bactéries – flèches creuses : empreintes bactériennes dans le CaCO_3 .

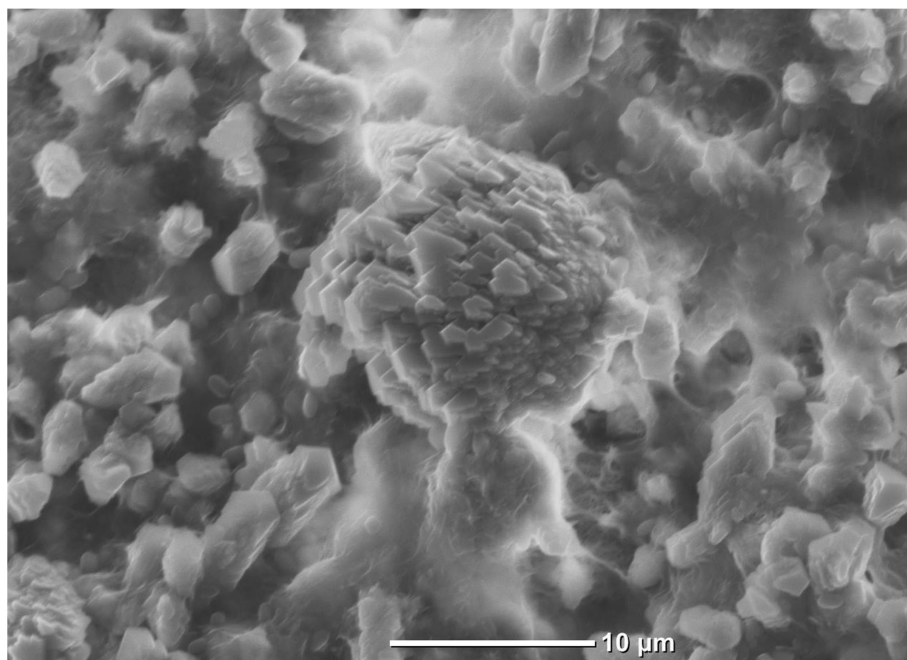


Figure 121 : Observation au MEB d'un sphérulite de carbonate de calcium au sein du dépôt d'injection dans l'échantillon C3, après 4 mois de traitement *in vitro*.

La morphologie des amas de cristaux observés correspond à celle des cristaux de calcite, mais les concrétions observées diffèrent de celles résultant du phénomène d'autocicatrisation abiotique. En effet, la couche d'autocicatrisation est formée de blocs monolithiques de 20 à 50 μm de long situés sous la couche de dépôt s'apparentant à des menhirs, ce qui n'est pas le cas ici. Les cristaux observés dans les échantillons ayant subi 4 mois de traitement de biocicatrisation sont constitués de plaquettes rhomboédriques de moins d'1 μm à l'instar de la calcite issue de l'autocicatrisation, mais les amas eux-mêmes sont de forme plus variable et se situent à la surface de dépôt. La forme de sphérulite observée pour certains amas (Figure 121) est une morphologie caractéristique du carbonate de calcium biosourcé, décrite à plusieurs reprises dans la littérature [58], [87]. Enfin, la présence d'orifices de dimensions identiques à celles des bactéries dans les amas de calcite (Figure 119, Figure 120) étaye l'hypothèse d'une origine biologique de ces concrétions. En effet, la formation de biocalcite entraîne la formation d'empreintes de bactéries dans les cristaux formés, empreintes résultant de la formation de la gangue autour de la bactérie puis de la disparition de cette dernière [58].

L'observation au MEB des sections des fissures ayant été inoculées en continu (Figure 122) révèle que le dépôt d'injection présente une structure poreuse et de nombreuses inclusions blanches, formant par endroits une couche totalement composée de cette matière. Ces inclusions sont en effet beaucoup plus abondantes que les inclusions de débris habituellement observées dans le dépôt d'injection en l'absence de bactéries.

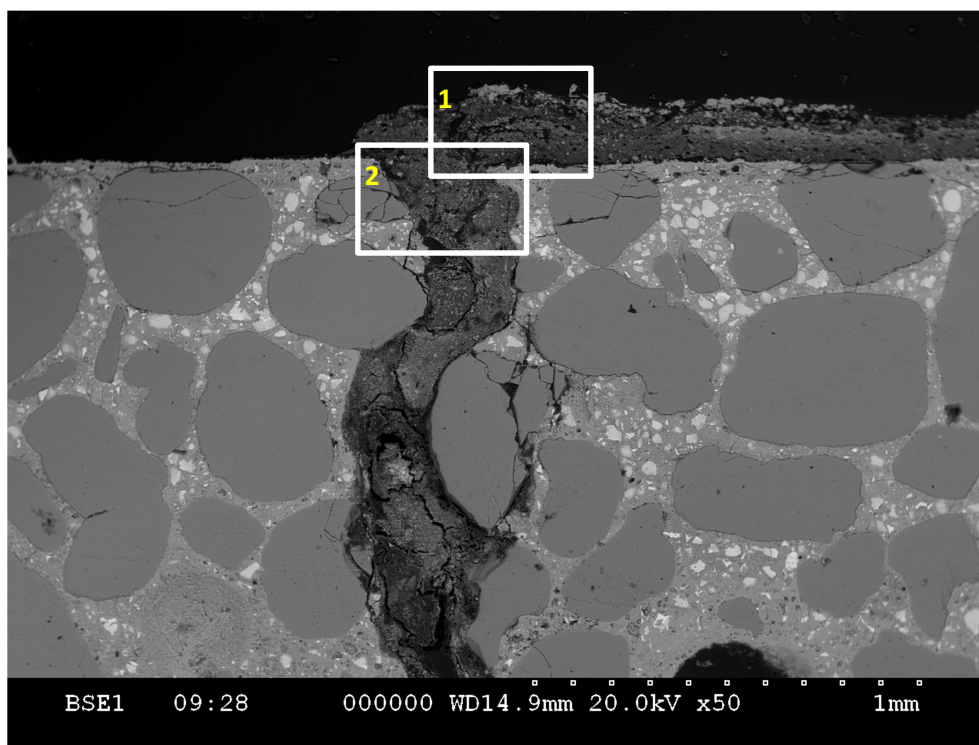


Figure 122 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement, à l'embouchure de la fissure.

L'analyse par EDS du dépôt d'injection à l'embouchure de la fissure (Figure 123, Figure 124) permet de connaître la composition des différentes couches de matière le composant :

- Les couches sombres (point n°2 et point n°4) sont composées à 55 % (+/- 5 %, en pourcentage atomique) d'oxygène, 5 % d'aluminium, 5 % de magnésium, 15 à 20 % de silicium, 15 à 20 % de calcium et 2 % de fer. Cette composition correspond à celle de la couche d'Attagel séché, les pourcentages pouvant varier du fait de la présence de particules au sein du dépôt d'injection ;
- Les zones claires (point n°1 et point n°3) sont composées à 75 % (+/- 5 %) d'oxygène et 25 % de calcium, ce qui correspond à la composition du carbonate de calcium.

Le dépôt d'injection est donc composé d'un mélange de carbonate de calcium et d'argile, à des proportions différentes selon la région considérée. On observe en effet des gradients de composition au sein du dépôt d'injection : la teneur en carbonate de calcium du dépôt d'injection est plus importante en surface de dépôt, mais celui-ci est essentiellement composé d'argile en profondeur. En outre, le dépôt est plus poreux dans les zones riches en carbonate de calcium que dans les zones essentiellement composées d'argile.

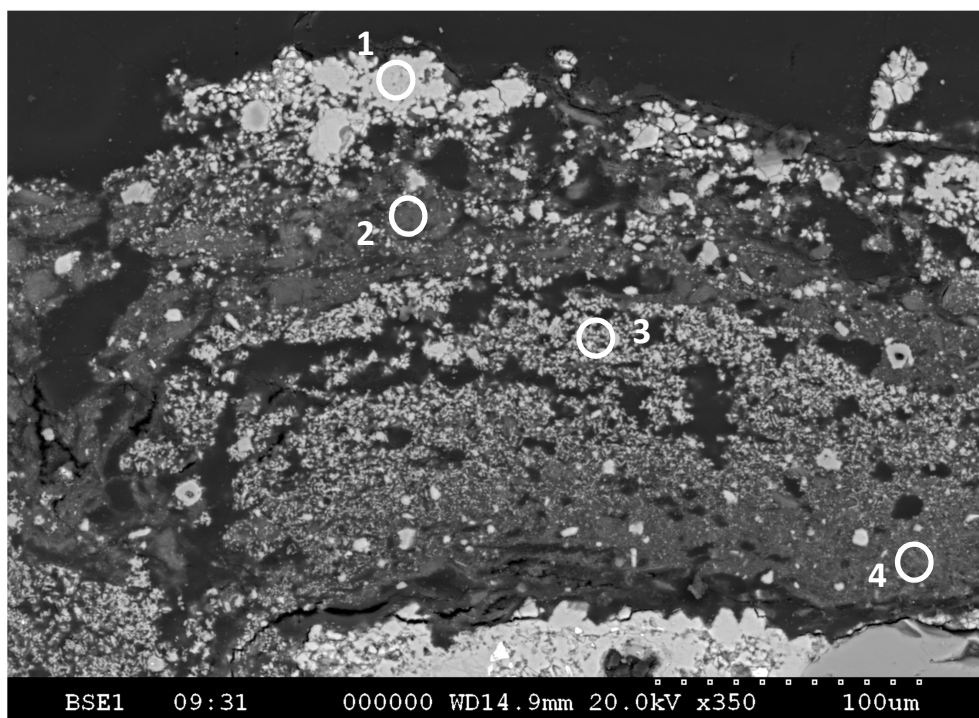


Figure 123 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement

(agrandissement de la zone encadrée n°1 de la Figure 122). Entouré : position des points de mesure par EDS.

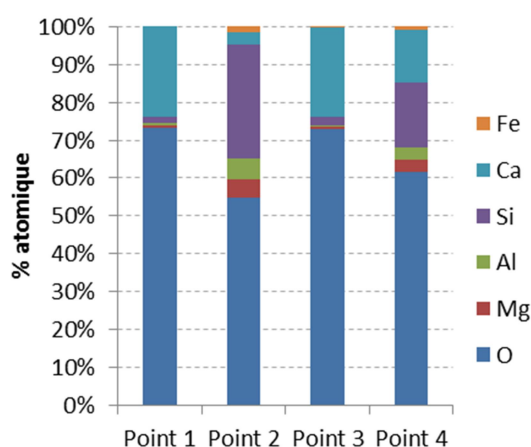


Figure 124 : Composition déterminée par EDS des points de mesure indiqués sur la Figure 123.

La Figure 125 représente le dépôt colmatant l'embouchure de la fissure, observé au MEB, au niveau de la zone encadrée n°2 de la Figure 122. On observe dans cette région de la fissure un dépôt colmatant en totalité la section de la fissure, essentiellement constitué de cristaux blancs et légèrement poreux.

L'analyse par EDS de ce dépôt (Figure 126) révèle qu'il est constitué essentiellement de CaCO_3 , mais la présence d'aluminium, de magnésium et de fer dans le dépôt montre qu'il contient de l'Attigel. En effet, on constate que les zones ciblées contiennent à la fois du dépôt d'Attigel (apparaissant en gris moyen) et des cristaux de carbonate de calcium (apparaissant en blanc), qui sont trop étroitement intriqués pour être analysés séparément par EDS. Il s'agit donc du même type de dépôt qu'en surface, c'est-à-dire d'une couche d'Attigel au sein de laquelle des cristaux de carbonate de calcium se sont formés. Les cristaux sont dans ce cas beaucoup plus dispersés au sein du dépôt d'injection.

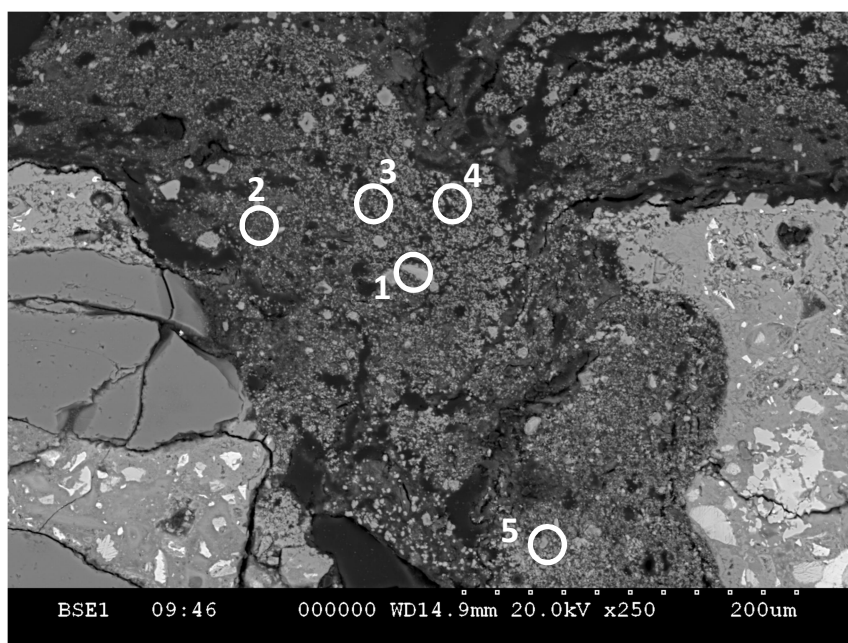


Figure 125 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement (agrandissement de la zone encadrée n°2 de la Figure 122). Entouré : position des points de mesure par EDS.

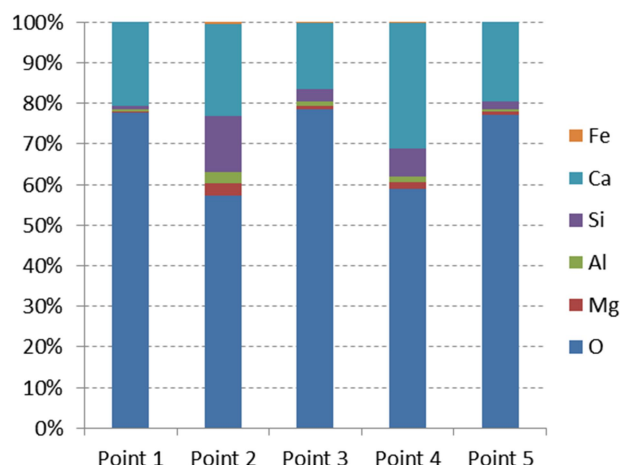


Figure 126 : Composition déterminée par EDS des points de mesure indiqués sur la Figure 125.

La Figure 127 montre une section de la fissure à environ 1 cm de la surface. On peut observer un dépôt gris sombre sur le matériau, qui est recouvert par une couche claire d'épaisseur comprise entre 10 et 20 μm , qui complète le pont formé entre les deux faces de la fissure. L'analyse EDS de cette zone (Figure 128) révèle que la couche superficielle est constituée de carbonate de calcium (Points n°1, 2 et 3), tandis que la couche inférieure est constituée d'argile et de débris (Points n°4 et 5). La couche de carbonate de calcium est plus fine qu'à la surface de la fissure, et n'est pas poreuse.

On note que la composition du dépôt au point de mesure n°3 est sensiblement différente de celle aux autres points, avec des teneurs faibles mais détectables en silicium, magnésium, aluminium et en fer. La présence de ces composés est probablement due à la présence d'argile dans le point analysé par EDS, ce qui révèle que les deux composés sont intriqués. Le carbonate de calcium observé ici a donc probablement été formé à l'intérieur du dépôt d'argile, dans sa partie superficielle, ce qui explique la présence de traces d'argile mélangés au carbonate de calcium à l'endroit analysé.

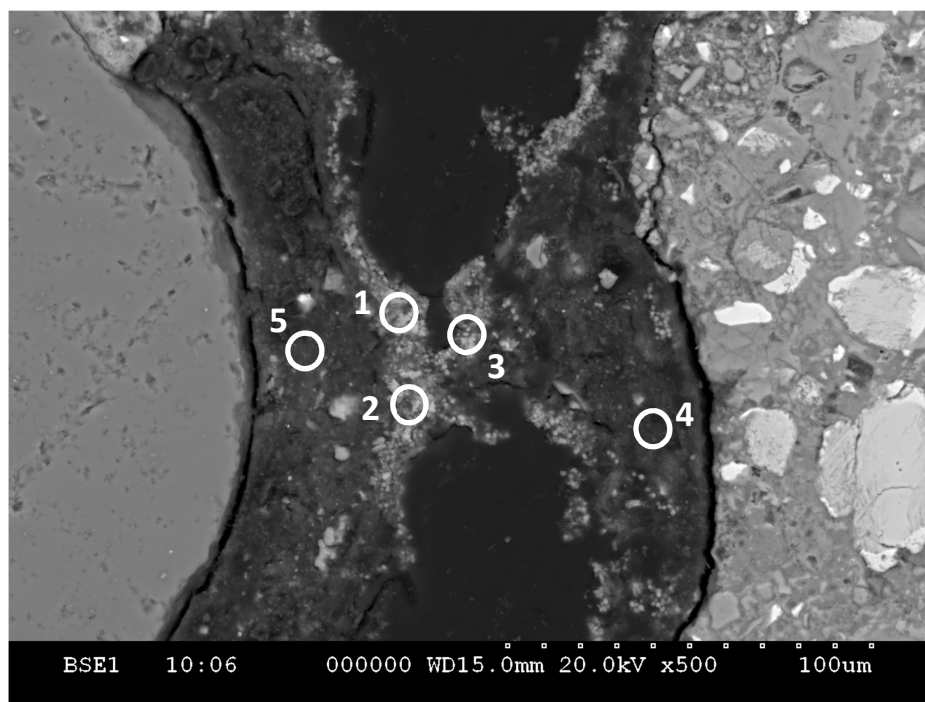


Figure 127 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement, à l'intérieur de la fissure. Entouré : position des points de mesure par EDS.

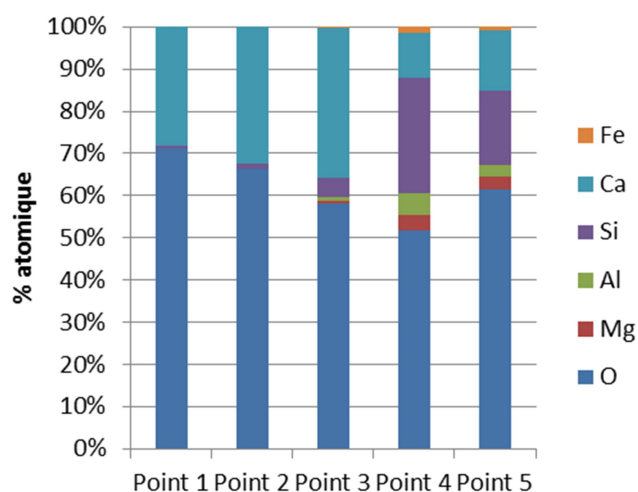


Figure 128 : Composition déterminée par EDS des points de mesure indiqués sur la Figure 127.

Plusieurs amas de dépôt d'injection peuvent être observés au sein de la fissure, et contiennent des quantités importantes de carbonate de calcium témoignant de la formation de carbonate de calcium postérieure à l'injection. Toutefois, la quantité de carbonate de calcium présente dans ces

amas est irrégulière, celui-ci pouvant être quasiment absent du dépôt ou en être le principal composant. En outre, plusieurs types de formations de carbonate de calcium ont pu être observés :

- CaCO_3 inclus dans le dépôt argileux (Figure 125). Cette structure a été observée à l'embouchure de la fissure et en profondeur. Le dépôt d'injection est une matrice mixte où des amas de CaCO_3 sont répartis dans l'ensemble du volume ;
- CaCO_3 formé à la surface du dépôt (Figure 127, Figure 129). On observe dans ce cas que le dépôt d'injection est recouvert d'une couche de CaCO_3 , mais que l'intérieur du dépôt d'injection reste essentiellement composé d'Attagel. Les cristaux peuvent être de petite taille et partiellement intégrés au dépôt (Figure 127), ou bien de grande taille et se former à la surface du dépôt (Figure 129).

Le carbonate de calcium biogénéré se distingue donc du carbonate de calcium d'origine abiotique par la présence d'empreintes de bactéries, mais aussi par la porosité de la couche de biocicatrisation et l'irrégularité de son épaisseur. Ces caractéristiques peuvent avoir un impact important sur le colmatage des fissures. En effet, la porosité importante de la couche de biocicatrisation permet d'obtenir un volume important par rapport à la masse obtenue, et donc un colmatage plus efficace. De plus, une répartition irrégulière de CaCO_3 augmente la probabilité de former des ponts, grâce à la formation d'amas de taille plus importante.

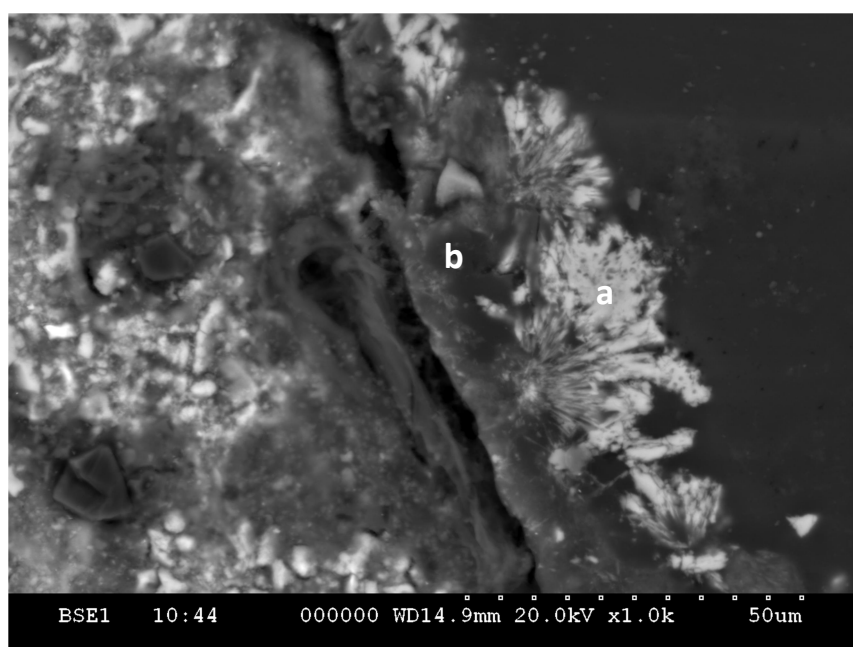


Figure 129 : Observation au MEB de la section polie de la fissure C3, après 4 mois de traitement, à l'intérieur de la fissure. Formation de carbonate de calcium (a) à la surface du dépôt d'injection (b).

6.3.3.1. Conclusion

Après quatre semaines de traitement, qui ont inclus deux injections de milieu épaissi inoculé avec *B. pseudofirmus*, la perméabilité à l'air des échantillons est fortement réduite, diminuant l'ouverture apparente des fissures de l'ordre de 170 μm . La comparaison des résultats obtenus avec ceux de témoins abiotiques suggère que l'activité bactérienne a un impact sur le colmatage des fissures bien que le milieu LNGW contribue significativement à la réduction de l'ouverture apparente des fissures. En revanche, aucune accumulation importante de carbonate de calcium n'a pu être observée à la surface ou à l'intérieur du dépôt d'injection lors des observations au MEB des surfaces brutes et de sections polies des fissures. Toutefois, la présence de bactéries et de sphérulites de calcite témoignent que le processus de biocicatrisation a débuté. Après 16 semaines de traitement, des signes de biocicatrisation importants sont observables aussi bien pour les échantillons inoculés en continu que pour les échantillons n'ayant été inoculés qu'au début du traitement :

- Développement d'un film bactérien visible à l'œil nu à la surface des fissures ;
- Observation d'accumulations importantes de CaCO_3 observables au MEB sur les surfaces brutes des échantillons, formations présentant souvent des empreintes témoignant de leur origine biologique ou des formes de sphérulites caractéristiques ;
- Observation d'accumulations importantes de CaCO_3 observables au MEB sur les sections polies des échantillons, formant des croûtes à la surface du dépôt d'injection ou se mêlant à celui-ci. Il y a donc eu un développement bactérien au sein des fissures, ainsi que la précipitation de carbonate de calcium en quantités importantes du fait de l'activité bactérienne, sans qu'une réinoculation bactérienne périodique ne soit nécessaire. Lorsque la biocicatrisation est réalisée en conditions optimales contrôlées, une seule inoculation bactérienne est suffisante pour assurer l'efficacité du procédé tout en apportant régulièrement les nutriments nécessaires à l'activité bactérienne.

Pour des fissures de l'ordre de 230 μm , il est difficile de mettre en évidence l'effet de l'activité bactérienne lorsque deux injections de milieux LNGW ont été réalisées dans la mesure où le dépôt d'Attagel réduit fortement l'ouverture apparente des fissures, ce qui peut masquer l'effet de la biocicatrisation sur la perméabilité à l'air des fissures. En revanche, le traitement est plus efficace lorsque la taille de la fissure est plus élevée et que l'Attagel n'a pas totalement comblé la fissure. Compte tenu de ces résultats, il conviendra de réaliser une seule injection de milieu LNGW dans le cas des essais *in situ*, de manière à faciliter la mise en œuvre du procédé et à observer plus facilement l'impact de l'activité bactérienne sur le colmatage des fissures.

6.3.4. Essais de biocicatrisation *in situ*

6.3.4.1. Introduction

Des essais de biocicatrisation sont réalisés en milieu extérieur pour observer les contraintes imposées par un environnement où les conditions de température et d'hygrométrie ne sont pas contrôlées. Ces changements de conditions peuvent fortement altérer le processus, et ce de plusieurs manières :

- Les microorganismes présents dans le milieu extérieur peuvent contaminer la fissure, consommer les nutriments du milieu injecté et proliférer dans la fissure, empêchant la croissance de *B. pseudofirmus*.
- Les changements de température, comme il a été observé au cours des essais de croissance, peuvent fortement altérer le développement bactérien, en ralentissant voire en stoppant la croissance et l'activité bactériennes.
- Les précipitations peuvent lessiver les bactéries et nutriments depuis la fissure, ce qui nuit au potentiel de biocicatrisation. Inversement, une période de sécheresse peut conduire à l'arrêt de l'activité bactérienne du fait du manque d'eau dans la fissure.

Ces essais ont donc pour objectif d'étudier l'impact de ces contraintes sur le procédé biocicatrisation. Ces essais ont toutefois été réalisés dans une atmosphère saturée en humidité, car le petit format des éprouvettes de mortier fissurées ne permet pas la mise au point d'une technique de maintien de l'humidité dans les fissures. Les méthodes assurant le maintien de l'eau dans les fissures seront abordées au cours des essais de biocicatrisation à l'échelle pilote.

6.3.4.2. Suivi de l'essai de biocicatrisation *in situ*

Après 4 semaines de traitement, on observe dans toutes les éprouvettes des traces importantes de précipité blanc ayant une forme d'oursin. Ces précipités sont présents à toutes les zones d'accumulation de milieu, en particulier aux lèvres de la fissure. Il s'agit probablement de lactate de calcium, qui est soluble, et a précipité suite au séchage du milieu LNG injecté après 2 semaines. Ce précipité est dissous lors de la réinjection de milieu LNG. Ces précipités témoignent d'un défaut d'humidification des fissures, dû à une condensation insuffisante dans les enceintes de biocicatrisation. Pour pallier ce problème, le volume d'eau dans les enceintes a été doublé. Après 6

semaines de traitement, la quasi-totalité des précipités ont disparu, et la quantité de précipités restants est trop faible pour altérer la perméabilité à l'air des fissures.

Dans le cas des éprouvettes non inoculées par la bactérie d'étude (nommée « Réf »), aucun développement biologique visible à l'œil nu n'est observable au cours du traitement, à l'exception d'un léger développement d'algues vertes autour de la fissure des échantillons Ref-3 et Ref-4. Tout au long de l'essai, les fissures sont légèrement humides ou sèches mais jamais complètement mouillées, ce qui peut expliquer le faible développement de microorganismes à la surface des échantillons.

La réduction d'ouverture apparente (OA) des fissures « Réf » suite au traitement est présentée dans le Tableau 35, et le suivi de l'OA des fissures au cours du traitement est présenté dans la Figure 130. La réduction de la perméabilité à l'air dans les échantillons « Réf » est très variable : on observe une diminution progressive de la perméabilité à l'air des échantillons, avec une réduction d'OA allant de 74 à 243 μm à la fin de l'essai. On observe une forte variabilité de l'évolution de l'OA dès le début du traitement, et qui se confirme tout au long du traitement (Figure 130). Les essais préliminaires présentés dans la partie 6.3.1 (page 195) ont montré que l'injection de milieu LNGW dans la fissure carbonatée provoque une réduction d'OA inférieure à 100 μm , et les travaux de Ducasse-Lapeyrousse *et al.* (2017) [130] montrent que le potentiel d'autocicatrisation de fissures carbonatées est inférieur à 50 μm même en présence de lactate de calcium, pour un mortier de composition identique. La réduction d'OA observée est donc anormalement élevée, l'autocicatrisation et le dépôt d'argile ne sont donc probablement pas les seuls facteurs de colmatage entrant en jeu dans ces échantillons.

Tableau 35 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 21 semaines de traitement in situ pour des mortiers fissurés non inoculés par la bactérie d'étude.

Echantillon	OA initiale (μm)	OA finale (μm)	Réduction d'OA (μm)	Taux de colmatage (%)
Ref-1	297	54	243	82
Ref-2	344	173	171	50
Ref-3	344	244	100	29
Ref-4	250	161	88	35

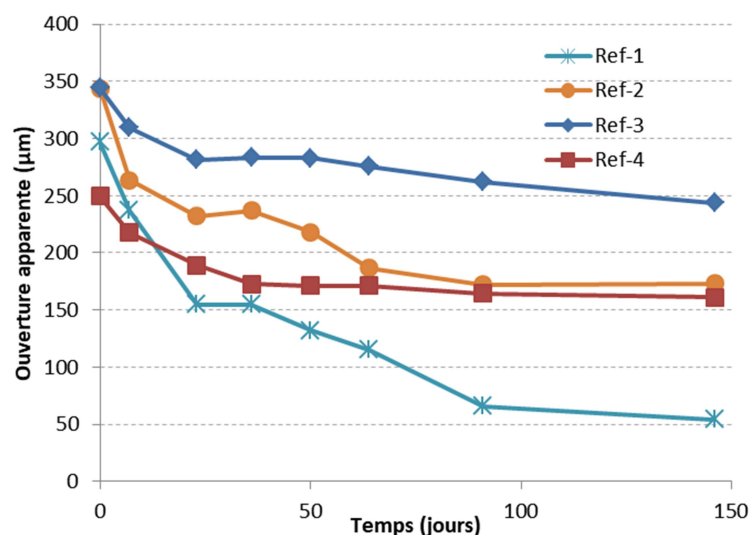


Figure 130 : Evolution de l'ouverture apparente des échantillons non inoculés par la bactérie d'étude au cours du traitement de biocicatrisation in situ.

Pour les échantillons inoculés par la bactérie d'étude, on observe après 2 semaines de traitement quelques moisissures noires sur sa surface de l'échantillon Inoc-4, mais pas au niveau de la fissure elle-même. Après 3 semaines de traitement, un très fort développement de champignons colmate en grande partie la fissure de l'échantillon Inoc-1, contribuant en partie à la réduction de son ouverture apparente de 183 à 115 µm entre la 3^{ème} et la 7^{ème} semaine de traitement (Figure 132).

Après 7 semaines de traitement, un fin biofilm de couleur saumon peut être observé sur l'échantillon Inoc-2, dont l'apparence correspond au biofilm observé lors des essais de biocicatrisation en conditions contrôlées (Figure 131). En outre, l'échantillon Inoc-4 présente un développement d'algues à l'ouverture de la fissure. Tout au long de l'essai, les fissures sont légèrement humides ou sèches mais jamais complètement mouillées, ce qui peut expliquer le faible développement des bactéries ou d'autres microorganismes issus du milieu extérieur.



Figure 131 : Photographie de l'échantillon Inoc-2 après 4 mois de traitement in situ.

Le Tableau 36 résume les résultats des mesures de perméabilité à l'air des échantillons inoculés à l'issue du traitement, et la Figure 132 présente le suivi de l'ouverture apparente de ces échantillons au cours du traitement. On observe une très forte variabilité des résultats entre les échantillons. En effet, les échantillons Inoc-1 et Inoc-2 (d'ouverture apparente initiale égale à 330 et 466 μm respectivement) voient leur ouverture apparente diminuer de plus de 200 μm , principalement au cours des 5 premières semaines de traitement, tandis que cette diminution est inférieure à 100 μm pour les échantillons Inoc-3 et Inoc-4 qui ont une ouverture apparente initiale plus faible, comprise entre 150 et 200 μm .

Tableau 36 : Ouvertures apparentes (OA) initiales et après 21 semaines de traitement in situ pour des mortiers fissurés inoculés.

Echantillon	OA initiale (μm)	OA finale (μm)	Réduction d'OA (μm)	Taux de colmatage (%)
Inoc-1	330	115	215	65
Inoc-2	466	189	277	59
Inoc-3	201	150	74	37
Inoc-4	167	83	84	50

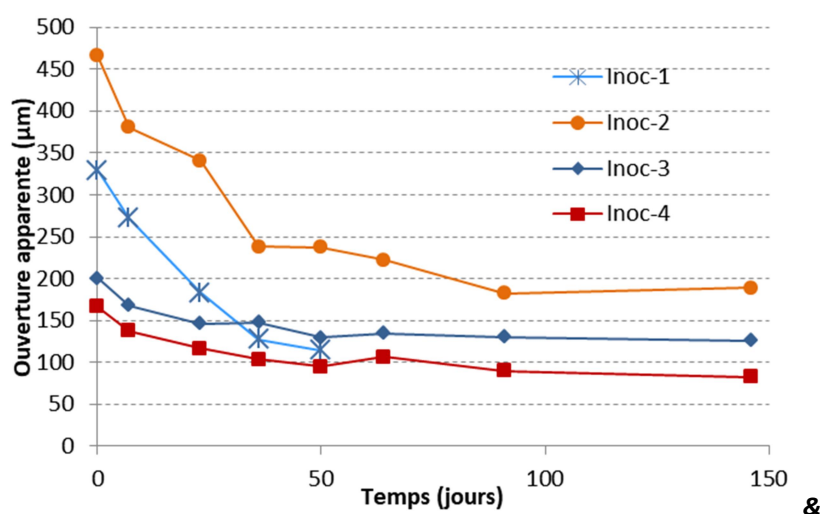


Figure 132 : Evolution de l'ouverture apparente des échantillons inoculés au cours du traitement de biocicatrisation in situ

Le suivi de la perméabilité à l'air lors du traitement *in situ* d'éprouvettes de mortier fissurées permet donc d'apporter les conclusions suivantes :

- Les éprouvettes fissurées, qu'il s'agisse des essais inoculés par la bactérie d'étude ou des échantillons non inoculés par cette souche, ont une forte tendance au séchage, ce qui se traduit par la formation de précipités issus du milieu LNG à la surface des fissures. Ces précipités sont toutefois solubles et peuvent être éliminés.
- Bien que la croissance de biofilm bactérien, de champignons et d'algues ait pu être observée, les microorganismes ne se développent pas de manière abondante à la surface des échantillons, probablement à cause de la faible rétention d'eau dans les fissures et sur les éprouvettes.
- Que ce soit pour les échantillons inoculés ou non inoculés par la bactérie d'étude, il y a une très forte variabilité de l'efficacité du traitement. En effet, la réduction d'OA varie entre moins de 100 μm et plus de 200 μm dans les deux cas (Figure 133, A), conduisant à une forte variabilité des taux de colmatage (Figure 133, A), il est donc impossible de déterminer si la biocicatrisation a eu un impact significatif sur le colmatage des fissures étudiées.
- Lorsque l'ouverture apparente est inférieure à 150 μm , le colmatage ne se poursuit plus. Il est possible que la faible perméabilité des fissures en soit la cause, car la circulation de l'oxygène, de l'eau et des nutriments pour les bactéries est limitée [193].

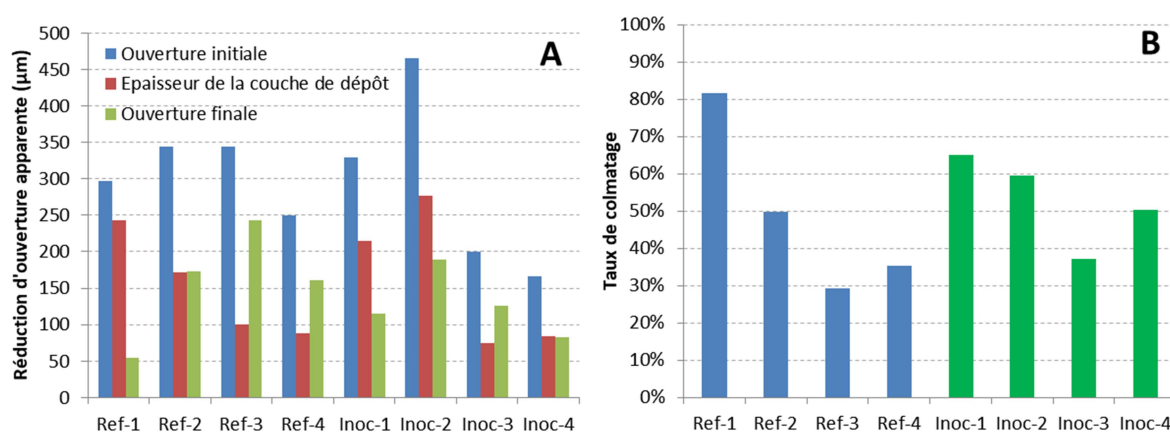


Figure 133 : Réduction d'ouverture apparente (A) et taux de colmatage (B) des fissures étudiées après 21 semaines de traitement in situ de mortiers fissurés.

6.3.4.3. Analyse des fissures en fin de traitement

A l'issue du traitement, les éprouvettes n'ayant pas été sacrifiées pour l'observation au MEB des fissures sont soumises à un test de résistance à la pression, suivi d'un test de résistance au lessivage. La Figure 134 présente pour chaque échantillon l'ouverture apparente (OA) après le traitement de biocicatrisation, après que la fissure ait été soumise à une pression de 5 bar, et après que de l'eau distillée ait été injectée dans la fissure.

L'OA des échantillons « Ref » n'est pas modifiée par l'application d'une forte pression, sauf pour l'échantillon Ref-1 pour lequel l'OA augmente de 25 μm . Cette augmentation de la perméabilité à l'air est toutefois exceptionnelle et est peut-être le résultat d'un biais de mesure. Le test de pression ne modifie pas l'OA de l'échantillon Inoc-4, et augmente de 8 μm l'OA de l'échantillon Inoc-1. L'application d'une pression de 5 bar sur les fissures n'a donc pas d'impact sur leur perméabilité à l'air, qu'elles aient été inoculées ou non.

Le test de résistance au lessivage a un impact plus important sur la perméabilité à l'air des fissures, et semble avoir le même impact sur les échantillons inoculés et non inoculés par la bactérie d'étude. En l'absence d'inoculation initiale par la bactérie d'étude, le lessivage provoque une augmentation de moins de 15 μm de l'OA de deux échantillons sur trois, tandis qu'il n'a pas d'impact sur l'OA de l'échantillon Ref-1. Le test de lessivage a un effet similaire sur les échantillons inoculés par la bactérie d'étude. En effet, sur les deux échantillons testés, l'OA de l'échantillon Inoc-3 augmente de 16 μm suite au test de lessivage, tandis que l'échantillon Inoc-4 ne semble pas affecté. Pour toutes les éprouvettes, l'injection d'eau distillée dans les fissures augmente donc faiblement la perméabilité à l'air des fissures.

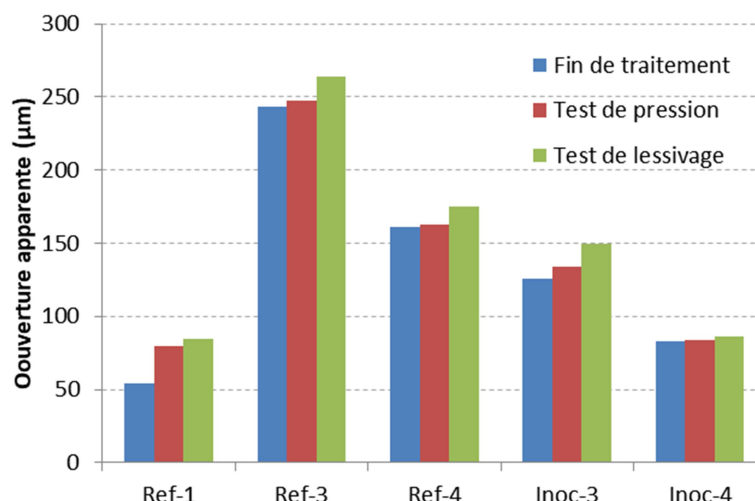


Figure 134 : Ouvverture apparente des éprouvettes à la fin du traitement de biocicatrisation, puis après les tests de résistance à la pression et au lessivage.

Ces résultats confirment les résultats obtenus lors des tests de résistance au vieillissement réalisés suite aux essais de biocicatrisation en conditions contrôlées : l'application d'une pression de 5 bar sur les fissures n'a pas d'impact sur leur perméabilité à l'air, et le rinçage des fissures à l'eau distillée augmente faiblement leur perméabilité à l'air. Ces résultats peuvent être expliqués par le biais des observations réalisées au cours de la caractérisation de la suspension WA 36, présentées dans le chapitre 4 :

- La résistance à la pression du dépôt formé suite au traitement peut être en partie expliquée par la résistance du dépôt argileux sec. En effet, celui-ci a une forte résistance mécanique et n'est pas endommagé par des débits d'air importants. Toutefois, l'augmentation d'OA observée pour l'échantillon Ref-1 montre qu'une légère augmentation de perméabilité à l'air peut se produire.
- La résistance des échantillons au lessivage provient en partie de l'insolubilité du dépôt d'injection. En effet, il a été observé que la suspension WA forme au séchage un film dur, qui n'est pas dissous mais seulement ramolli lors d'un nouveau mouillage. Ainsi, le dépôt d'injection n'est pas lessivé hors de la fissure lors de l'injection d'eau, et celui-ci conserve sa capacité de colmatage après avoir été rincé.

La Figure 135 montre l'intérieur des fissures des échantillons non inoculés par la bactérie d'étude, observées au MEB à faible grossissement. Les faces intérieures des fissures de ces échantillons, observées au MEB, montrent un dépôt d'injection ne recouvrant que partiellement l'intérieur des fissures, et formant des crêtes épaisses.

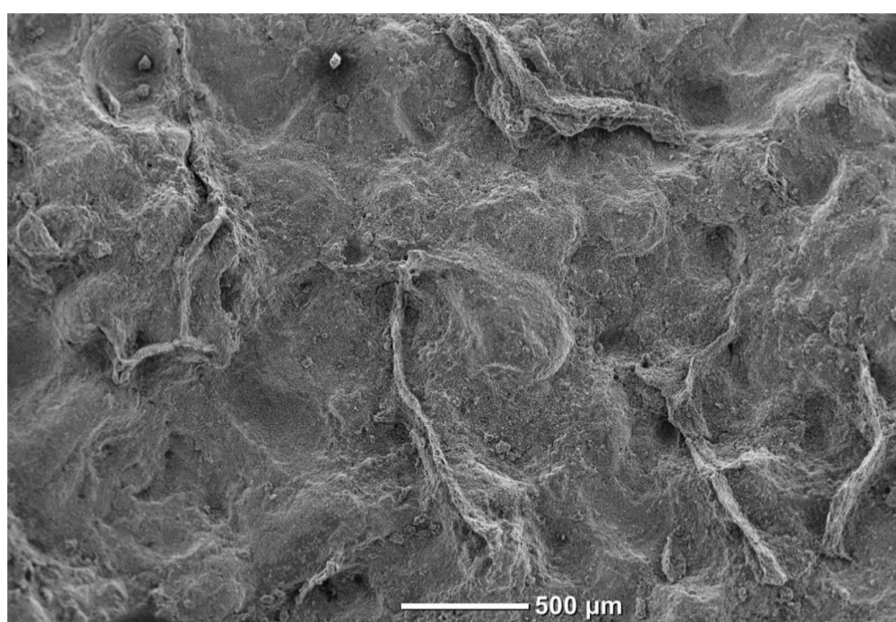


Figure 135 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ, cliché à faible grossissement.

La Figure 136 présente des observations du dépôt sur des zones vierges ou partiellement couvertes de biofilm. Le dépôt lui-même est principalement composé d'argile, contenant des particules de nature variée (Figure 136, A). Une faible fraction de la surface des fissures est recouverte d'une couche de biofilm (Figure 136, B), ce qui témoigne du développement de microorganismes à l'intérieur de la fissure. La nature de ces microorganismes n'a pas pu être déterminée. Plusieurs formes s'apparentant à des sacs dégonflés, d'environ 10 μm de diamètre, peuvent être observés sur le biofilm. Il s'agit vraisemblablement de spores de champignons.

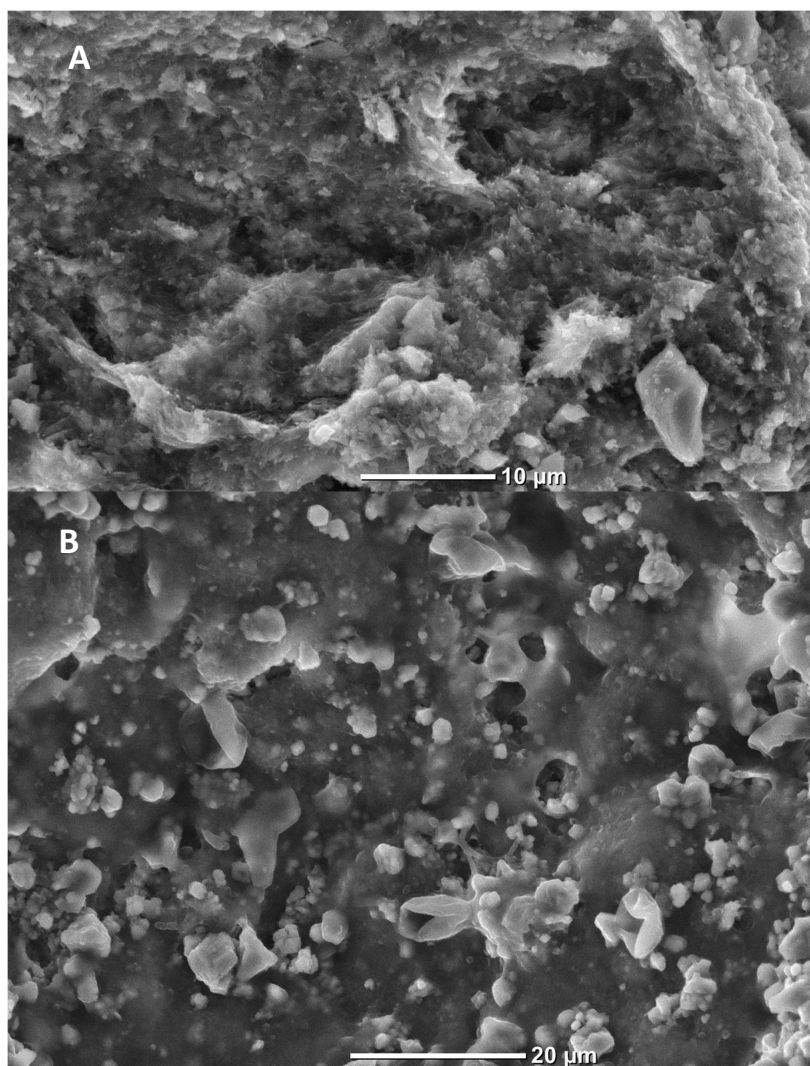


Figure 136 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ. A – zone de dépôt d'injection vierge ; B – zone recouverte de biofilm.

Les surfaces de la fissure Ref-2 non recouvertes par le dépôt d'injection observées au MEB (Figure 137), révèlent une densité très importante de carbonate de calcium à la surface du mortier, sous forme de monolithes de 10 à 30 μm de longueur, composés de cristaux rhomboédriques d'environ 1 μm de côté, orientés de la surface du mortier vers l'intérieur de la fissure. Cette morphologie correspond à celle observée au niveau de la couche d'autocicatrisation abiotique des fissures lors de la caractérisation du mélange Welan-Attagel, il s'agit donc très vraisemblablement de calcite formée par autocicatrisation lors de la carbonatation des éprouvettes.

Compte tenu de la forte réduction d'ouverture apparente mesurée au cours du traitement, il est possible que des microorganismes provenant du milieu extérieur aient colonisé la fissure et aient partiellement biocicatrisé la fissure. Il n'a toutefois pas été possible d'identifier formellement de cristaux de CaCO_3 d'origine biologique sur la portion de la fissure observée au MEB, tels que des cristaux associés à du biofilm, ayant une morphologie similaire aux cristaux biosourcés décrits dans la littérature (voir partie 1.2.4), ou présentant des empreintes de bactéries. Les observations réalisées ne permettent donc pas de déterminer si la forte réduction de perméabilité de la fissure mesurée est due à l'activité biologique ou à des facteurs abiotiques comme le lessivage de la portlandite. En effet, il est possible que le processus d'autocicatrisation ait été favorisé par les conditions de l'essai. Du fait des réinjections périodiques de milieu LNG, du stockage des éprouvettes dans une atmosphère saturée en humidité et des variations journalières de température, les éprouvettes sont exposées à des cycles de mouillage-séchage, dans un milieu très riche en ions calcium. Malgré le traitement de carbonatation auxquelles les fissures ont été soumises, il n'est pas impossible que ces conditions aient favorisé le lessivage de la portlandite et la migration d'ions calcium depuis des couches plus profondes du matériau.

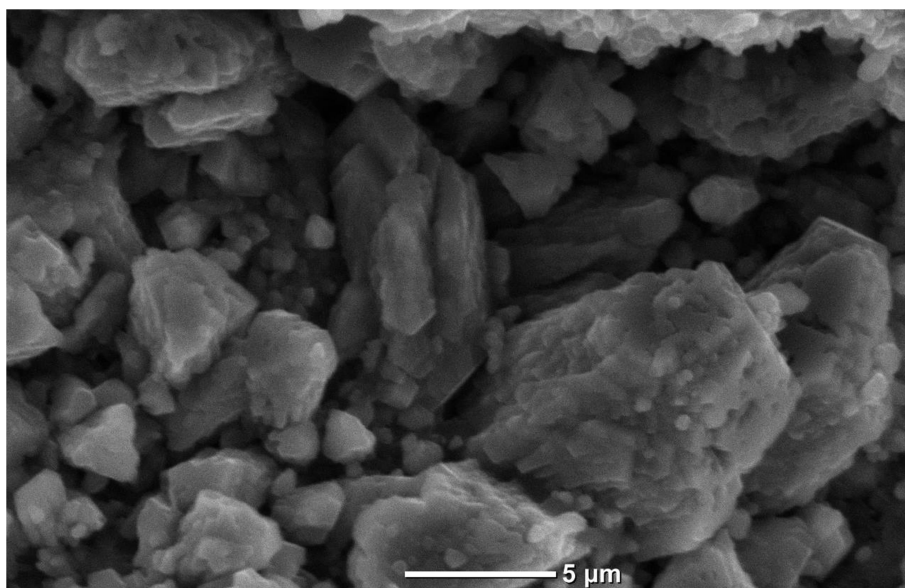


Figure 137 : Observation au MEB de l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ : détail de la couche d'autocicatrisation.

L'observation des zones d'écaillage du dépôt d'injection au sein de l'échantillon Ref-2 permet de constater que cette couche de calcite est située en-dessous de la couche de dépôt argileux. En

effet, on observe sur la Figure 138 que le dépôt d'injection recouvre les cristaux de carbonate de calcium.

On peut observer différentes structures sur ce cliché :

- La couche d'autocicatrisation de CaCO_3 à gauche (a), formant un tapis de menhirs de 5 à 10 μm de long ;
- Une partie de la couche d'autocicatrisation partiellement incluse dans le dépôt d'injection (c). On constate l'existence d'une zone vide (b) entre la couche d'autocicatrisation et le dépôt d'injection. Il est probable que le dépôt d'injection ait emporté ces cristaux en se rétractant lors du séchage de la fissure.
- Le dépôt d'injection lui-même (d), composé essentiellement d'aiguilles d'argile et incluant des particules diverses.

Cette structure a la même apparence que la couche d'autocicatrisation abiotique recouverte de dépôt argileux ayant été décrite au cours de la caractérisation du dépôt d'injection (Figure 87 et Figure 88, partie 4.3.3), il s'agit donc du même élément. On note que la couche d'autocicatrisation observée se situe sous le dépôt d'injection, on peut donc en déduire que sa formation est antérieure au traitement. Il n'y a donc probablement pas eu d'autocicatrisation abiotique durant le traitement.

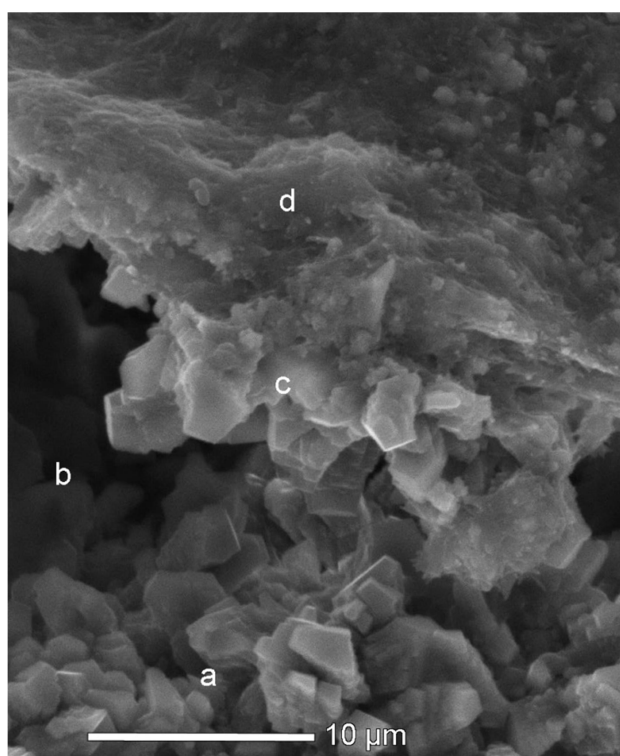


Figure 138 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Ref-2 à l'issue du traitement in situ. a – couche d'autocicatrisation ; b – zone interfaciale ; c – CaCO_3 lié au dépôt d'injection ; d – dépôt d'injection.

L'observation au MEB des surfaces brutes des échantillons inoculés par la bactérie d'étude (Figure 139) montre que la majeure partie de la surface interne de la fissure est recouverte de dépôt argileux, et présente peu de zones non couvertes. Ce dépôt a une composition variable en fonction de la zone observée, et plusieurs zones peuvent être distinguées :

- Les zones où le dépôt argileux est principalement composé d'un tapis d'argile (Figure 139), parsemé de particules peu nombreuses. Dans ces zones, le dépôt est similaire à celui observé dans les échantillons « Ref », mais le dépôt argileux est recouvert d'un film fin lisse et transparent témoignant de la formation d'un biofilm au sein de la fissure.
- Les zones où le dépôt est recouvert d'amas de cristaux percé d'orifices circulaires de 1 à 2 μm de diamètre (Figure 140, B ; Figure 141). Dans ces zones, des amas de 5 à 20 μm de côté recouvrent le tapis argileux, et ces amas sont formés de cristaux rhomboédriques d'environ 1 μm de côté. Les amas peuvent avoir la forme de piliers, mais sont généralement de forme irrégulière.

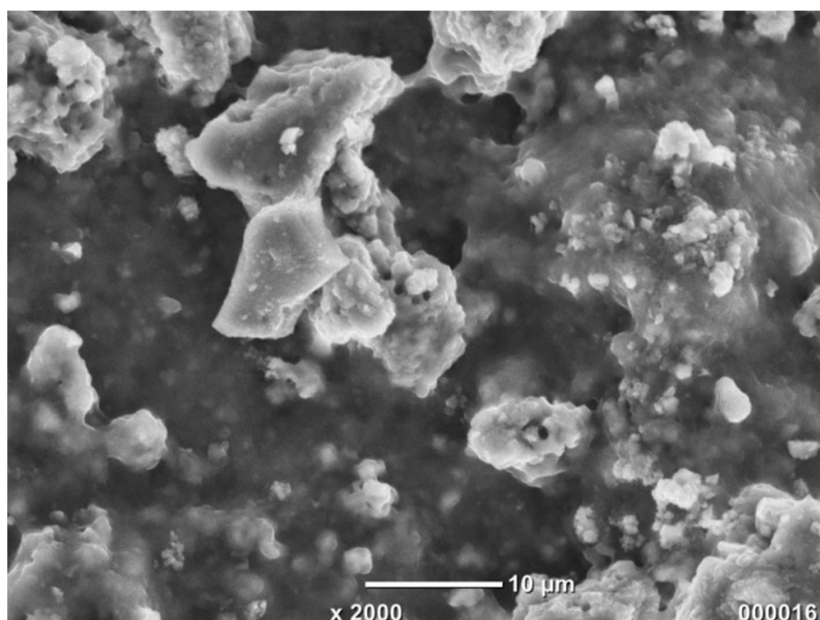


Figure 139 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2, zone de dépôt recouverte de biofilm.

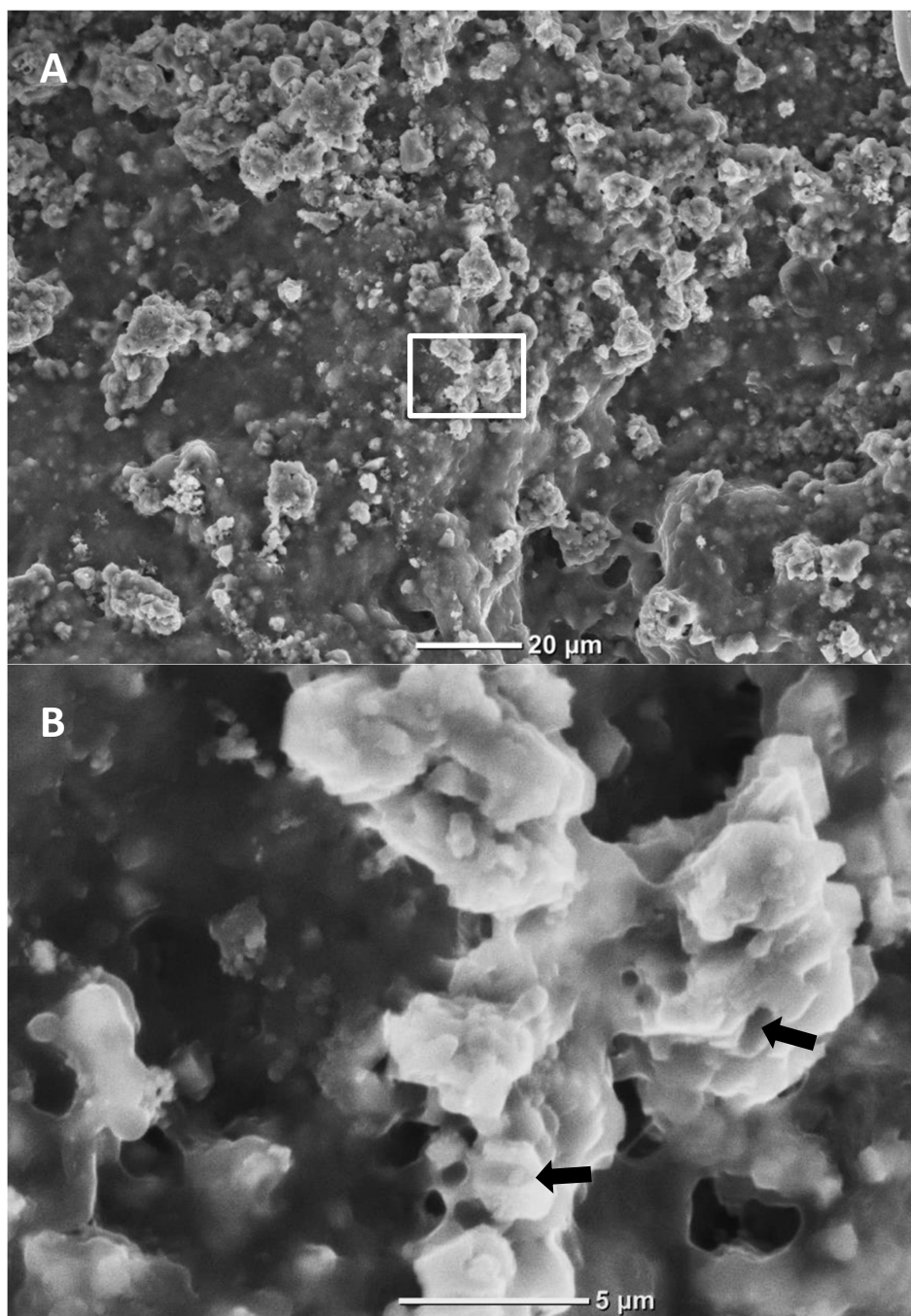


Figure 140 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2. A – zone de dépôt recouverte de biofilm et d'amas de CaCO_3 ; B – agrandissement de la zone encadrée. Flèches : empreintes bactériennes dans un amas de CaCO_3 .

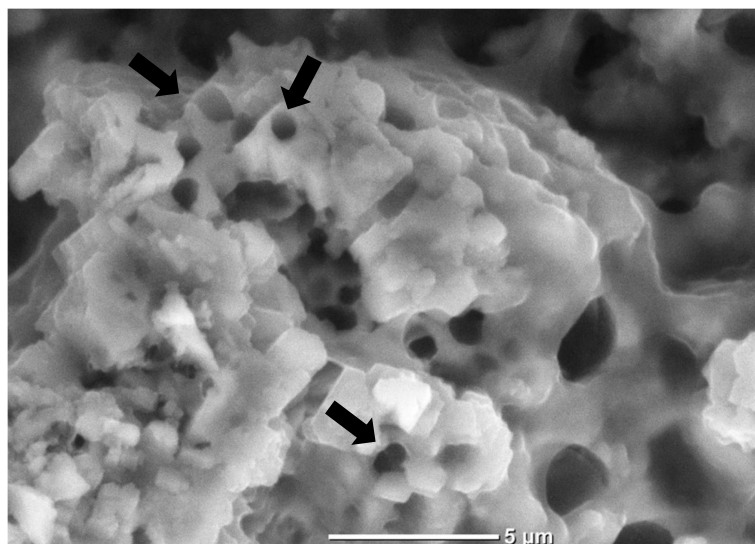


Figure 141 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2. Flèches : empreintes bactériennes dans un amas de CaCO_3 .

La forme et la taille des cristaux constituant les amas permettent de les identifier comme étant composés de carbonate de calcium, et les perforations observées dans les amas de CaCO_3 sont de taille et de forme identiques aux bactéries. En effet, les zones du dépôt argileux recouvertes d'amas cristallins ont une apparence similaire à celles observées dans les échantillons inoculés lors des essais de biocicatrisation en conditions contrôlées. Ces amas de CaCO_3 diffèrent par plusieurs aspects des amas carbonate de calcium provenant de l'autocicatrisation :

- Par leur localisation. Ces amas sont formés à la surface du dépôt d'injection, contrairement au carbonate de calcium d'autocicatrisation qui se forme à la surface du mortier ;
- Par leur forme. Les amas formés sont de forme irrégulière, par opposition à la forme de menhir généralement observée pour les amas de CaCO_3 formés suite au phénomène d'autocicatrisation ;
- Par la présence d'empreintes dans les cristaux. Ces empreintes ne sont jamais observées dans les échantillons non inoculés par la bactérie d'étude, et sont courantes dans les amas de CaCO_3 observés dans les échantillons inoculés.

Il s'agit donc vraisemblablement de CaCO_3 formé par biominéralisation à la surface du dépôt argileux, et les perforations observées correspondent aux empreintes des bactéries.

On observe en outre des empreintes beaucoup plus larges, de 2 à 4 μm de côté, au sein desquelles on distingue une membrane affaissée sur elle-même. Il peut s'agir de bactéries ou de spores fongiques dont la membrane s'est repliée sur elle-même après la mort (plasmolyse). Les essais de croissance de *B. pseudofirmus* ont démontré que dans le milieu épaissi, la morphologie et la taille des bactéries peuvent être très variables, ce qui expliquerait leur grande taille par rapport aux bactéries observées précédemment (1,5 μm). Dans ces zones, le dépôt d'injection est généralement recouvert d'un film fin, qui a été identifié au cours des essais de biocicatrisation en conditions contrôlées comme étant du biofilm bactérien. On observe cependant que ce film est plus épais et poreux par endroits, ce qui suggère un développement important.

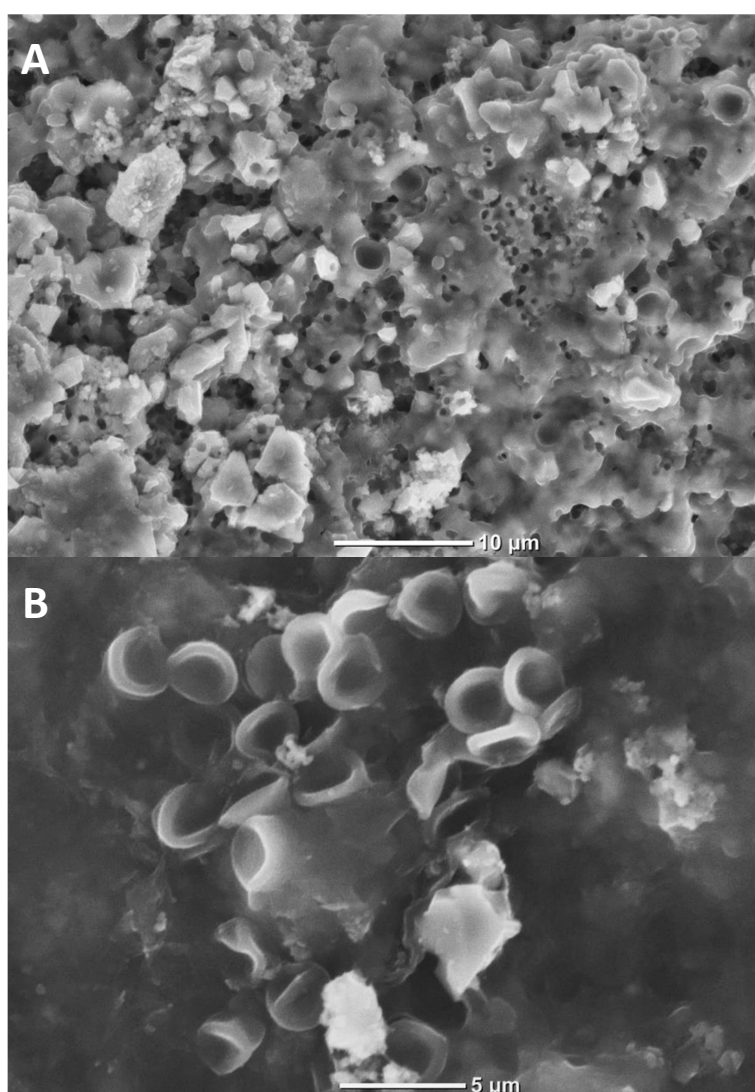


Figure 142 : Observation au MEB du dépôt d'injection dans l'échantillon Inoc-2. A – zone recouverte de biofilm et d'amas de CaCO_3 ; B – cellules plasmolysées intégrées au biofilm.

6.3.4.4. Conclusion

Le traitement *in situ* de mortiers fissurés par exobiocicatrisation a confirmé la difficulté de mise en œuvre de bioprocédés dans des environnements exposés, où les conditions de stérilité et de température ne sont pas contrôlées. En effet, les éprouvettes de mortier fissurées traitées par exobiocicatrisation *in situ* durant quatre mois n'ont pas présenté une réduction de l'ouverture apparente des fissures significativement différente des échantillons non inoculés par la bactérie d'étude, dans lesquels du milieu épaissi stérile a été injecté. Il est probable que le rôle des bactéries dans le colmatage des fissures ait été occulté par l'action du milieu épaissi lui-même. En effet, l'injection de milieu épaissi contribue fortement à la réduction de la perméabilité à l'air des fissures, et la variabilité de ce colmatage rend difficile la quantification du colmatage apporté par la biocicatrisation elle-même.

Les observations réalisées au MEB sur l'intérieur des fissures inoculées confirment que la souche bactérienne *B. pseudofirmus* a pu se développer dans les mortiers fissurés et placés en extérieur, et qu'il y a eu une biominéralisation de carbonate de calcium au sein des fissures. En effet, l'observation des surfaces brutes révèle la présence d'une couche de biofilm sur la majeure partie du dépôt d'injection. De nombreux amas de CaCO_3 peuvent être observés au sein de ce biofilm, dont l'origine biologique est confirmée par la présence d'empreintes bactériennes dans les cristaux formés, et par leur localisation à la surface du dépôt d'injection. Il n'a pas été possible de réduire l'ouverture apparente des fissures en dessous de 83 μm , ce qui peut être dû à la réduction de la diffusion de l'oxygène, de l'eau et des nutriments dans les couches profondes des éprouvettes.

Le traitement des fissures par exobiocicatrisation *in situ* a donc permis, malgré les contraintes importantes imposées par une application en extérieur, de réduire significativement l'ouverture apparente de fissures d'ouverture comprise entre 150 et 470 μm , à l'aide d'un dépôt solide mêlant argile, biofilm bactérien et carbonate de calcium biogénéré. Ce dépôt est résistant à des pressions allant jusqu'à 5 bar ainsi qu'au lessivage par de l'eau, il présente donc une durabilité importante, ce qui en fait un matériau de réparation particulièrement intéressant.

CHAPITRE 7.

Essais de biocicatrisation à l'échelle pilote

7.1. Introduction

Ces essais reprennent le principe des essais de biocicatrisation *in situ* mais ont été réalisés sur une dalle de béton fissurée. Ces essais visent à prouver l'applicabilité à plus grande échelle du procédé de biocicatrisation mise au point en laboratoire, et à identifier dans quelle mesure ce changement d'échelle peut modifier la mise en œuvre de la biocicatrisation.

Pour ce faire, un procédé expérimental a été mis au point : une dalle de béton armée a été préparée, puis des fissures transversales y ont été générées de manière contrôlée, par traction des barres d'armature la traversant. Le protocole expérimental de biocicatrisation employé sur les éprouvettes fissurées a en outre été adapté pour répondre aux contraintes générées par le changement d'échelle.

7.2. Matériel et méthodes

Les essais à l'échelle pilote sont réalisés sur une dalle de béton fissurée et carbonatée mesurant 1*2*0,15 m. La dalle est réalisée avec un béton dont la composition est la suivante : 310 kg.m⁻³ de ciment Portland Ordinaire (type GU), 857 kg.m⁻³ de sable, 1010 kg.m⁻³ de granulats de calibre P10, pour un rapport E/C de 0,6. La dalle est traversée par trois barres d'armature de 30 mm filetées à leurs extrémités par un filetage fin. La dalle est coulée manuellement sans vibration et curée durant 28 jours à 100 % d'humidité, à 21°C +/- 2°C.

Dix plaques de 1 mm d'épaisseur et de 5 cm de largeur sont placées dans le coffrage lors du coulage, servant d'initiateurs de fissure créant des points de fragilité dans la dalle (représentées en brun sur la modélisation en Figure 143). La dalle est ensuite montée sur un cadre renforcé (Figure 144) de la manière suivante :

- D'un côté, les barres d'armatures sont maintenues au cadre de traction par une plaque d'acier et deux écrous haute résistance, évitant que ce côté des barres ne se déplace par rapport au cadre.
- De l'autre côté, les barres d'armature filetées sont rallongées par des adaptateurs, et un vérin hydraulique est monté dessus, maintenu en place par deux plaques d'acier et un support en acier. Ce dispositif permet aux vérins de tirer les barres d'armature pour les étirer, et ainsi créer des fissures transversales dont l'ouverture est contrôlée.

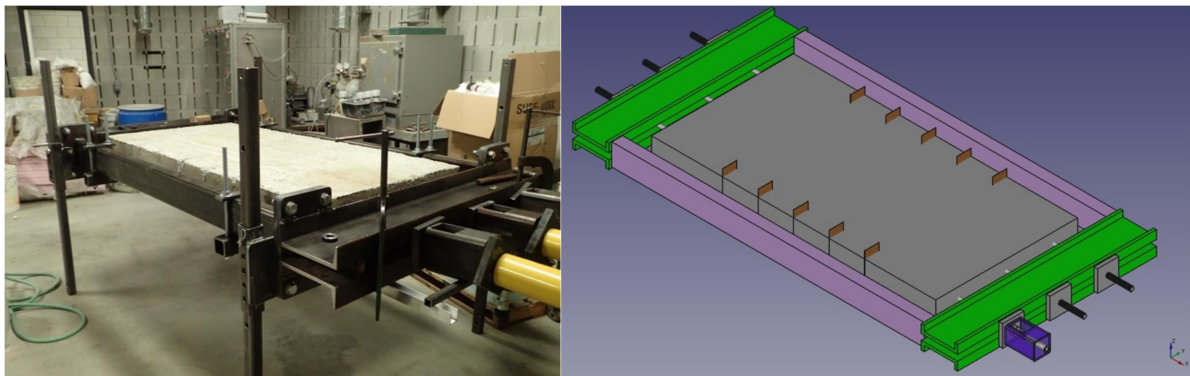


Figure 143 : Photographie et représentation en 3D de la dalle de béton sur le cadre de traction.

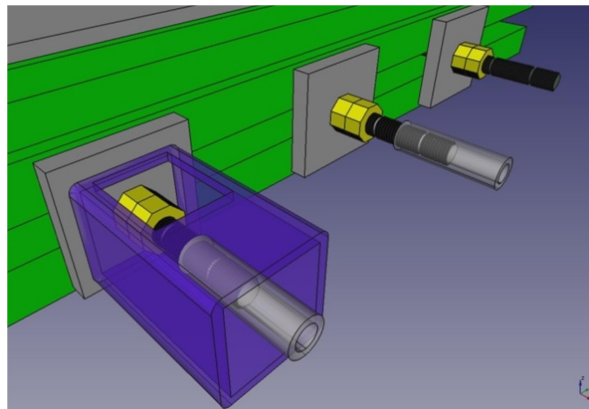


Figure 144 : Détail du dispositif de traction. De droite à gauche : verrouillage de base, avec adaptateur pour rallonge, avec chaise d'acier (en bleu) et adaptateur.

Pour réaliser la fissuration de la dalle, les vérins sont mis en fonction simultanément à l'aide d'une pompe manuelle, permettant de contrôler la pression appliquée avec plus de précision qu'avec une pompe automatique. Au fur et à mesure que la pression des vérins étire les barres d'armatures, des fissures transversales sont formées à différents endroits de la dalle. La pression est

progressivement augmentée de manière à contrôler précisément l'ouverture des fissures. La pression est augmentée jusqu'à l'obtention d'au moins deux fissures similaires d'ouverture comprise entre 500 μm et 1 mm. Une fois les fissures formées, les écrous de maintien sont resserrés, afin de maintenir les barres en tension, puis la pression est relâchée et les vérins sont retirés.

Un récipient d'eau est placé sur la dalle, puis celle-ci est emballée hermétiquement dans une bâche plastique. Une arrivée de CO_2 pur est raccordée au récipient à travers la bâche, puis le débit est réglé de manière à obtenir un bullage léger. Ainsi, la dalle est maintenue dans une atmosphère riche en CO_2 à 100 % d'humidité. La carbonatation est poursuivie durant 14 jours. A la fin de la période de carbonatation, une carotte de béton est prélevée au niveau d'une fissure et testée à la phénolphthaléine pour vérifier l'état de carbonatation. Si le pH est encore supérieur à 8,6 (solution rose au lieu d'incolore) dans la fissure, la carbonatation est prolongée d'une semaine. Au bout de 2 semaines, les fissures se sont avérées être carbonatées, et la carbonatation a été stoppée.

Deux fissures ayant des ouvertures proches comprises entre 500 μm et 1 mm sont sélectionnées pour le traitement de biocicatrisation. Ces fissures sont perpendiculaires à la longueur de la dalle et parcourent toute sa largeur. Pour chacune des fissures étudiées, toute la fissure à l'exception du point d'injection est au préalable couverte avec une bande d'adhésif aluminium, qui est ensuite couverte avec une couche de scellant polyuréthane. Cette opération a pour but de canaliser le milieu épaissi à l'intérieur de la fissure et empêcher les fuites lors de l'injection. Le sabot d'injection est collé sur le point d'injection à l'aide du scellant, et le dispositif est laissé à sécher durant 48 h (Figure 145).



Figure 145 : Sabot d'injection mis en place sur la dalle fissurée à l'aide de scellant polyuréthane.

Après séchage du scellant polyuréthane sur le dispositif d'injection, Les fissures sont traitées suivant le protocole suivant, présenté de façon schématique sur la Figure 146 :

- Le milieu épaissi LNGW, contenant 0,3 % de Welan et 6 % d'Attigel, est injecté dans la fissure en excès. Du milieu épaissi stérile est injecté dans la première fissure (nommée Référence), tandis que la fissure inoculée est traitée avec du milieu épaissi inoculé avec un culot de centrifugation issu d'une préculture de *B.pseudofirmus* en milieu NBN. La méthode de culture et la méthode d'inoculation employées sont identiques à celles employées pour les essais de biocicatrisation sur des éprouvettes de mortier fissurées.
- Après une heure, le sabot d'injection est retiré ainsi que l'ensemble scellant-adhésif recouvrant le reste de la fissure. Enfin, un feutre géotextile épais est posé sur la dalle et couvert d'une bâche, puis arrosé pour maintenir la fissure humide. Le dispositif est laissé à température ambiante dans le laboratoire.
- Après une semaine de traitement, le géotextile et la bâche sont retirés et la dalle est séchée durant 24 h, afin de réaliser une mesure de perméabilité à l'eau (voir protocole ci-après).
- Les fissures sont à nouveau préparées pour subir une injection (mise en place du colmatage de surface et du sabot d'injection), puis une nouvelle injection de milieu LNGW est réalisée, de la même manière que pour la première injection.
- Le dispositif d'injection est retiré une heure après injection, et la dalle est couverte avec le géotextile humide et une bâche.
- Après une semaine, le géotextile et la bâche sont retirés et la dalle est laissée à sécher durant 24 h, afin de réaliser une mesure de perméabilité à l'eau (voir protocole ci-après).
- Les fissures sont à nouveau préparées pour subir une injection (mise en place du colmatage de surface et du sabot d'injection), puis une injection de milieu LNG (non épaissi) est réalisée. Pour cette injection, le milieu LNG est injecté stérile, que ce soit pour la fissure de référence ou la fissure inoculée.
- Le dispositif d'injection est retiré une heure après injection, et la dalle est couverte avec le géotextile et une bâche. Le feutre géotextile est maintenu continuellement humide par arrosage hebdomadaire.
- Au bout d'un an, le géotextile et la bâche sont retirés et la dalle est laissée à sécher durant 24 h, afin de réaliser une mesure de perméabilité à l'eau (voir protocole ci-après).
- Après que les mesures de perméabilité à l'eau aient été réalisées, des carottes sont prélevées sur les fissures, à l'aide d'un carottier d'un diamètre intérieur de 5 cm. Les

surfaces brutes des fissures sont par la suite observées au MEB de la même manière que pour les essais de biocicatrisation réalisés sur les éprouvettes de mortier fissurées. Du fait de la taille des carottes, les sections polies des fissures n'ont toutefois pas été réalisées.

Comme pour les essais réalisés *in situ*, l'expérimentation n'a pas été réalisée en conditions stériles, par conséquent il est probable que les fissures puissent êtreensemencées par d'autres microorganismes venant du milieu environnant.

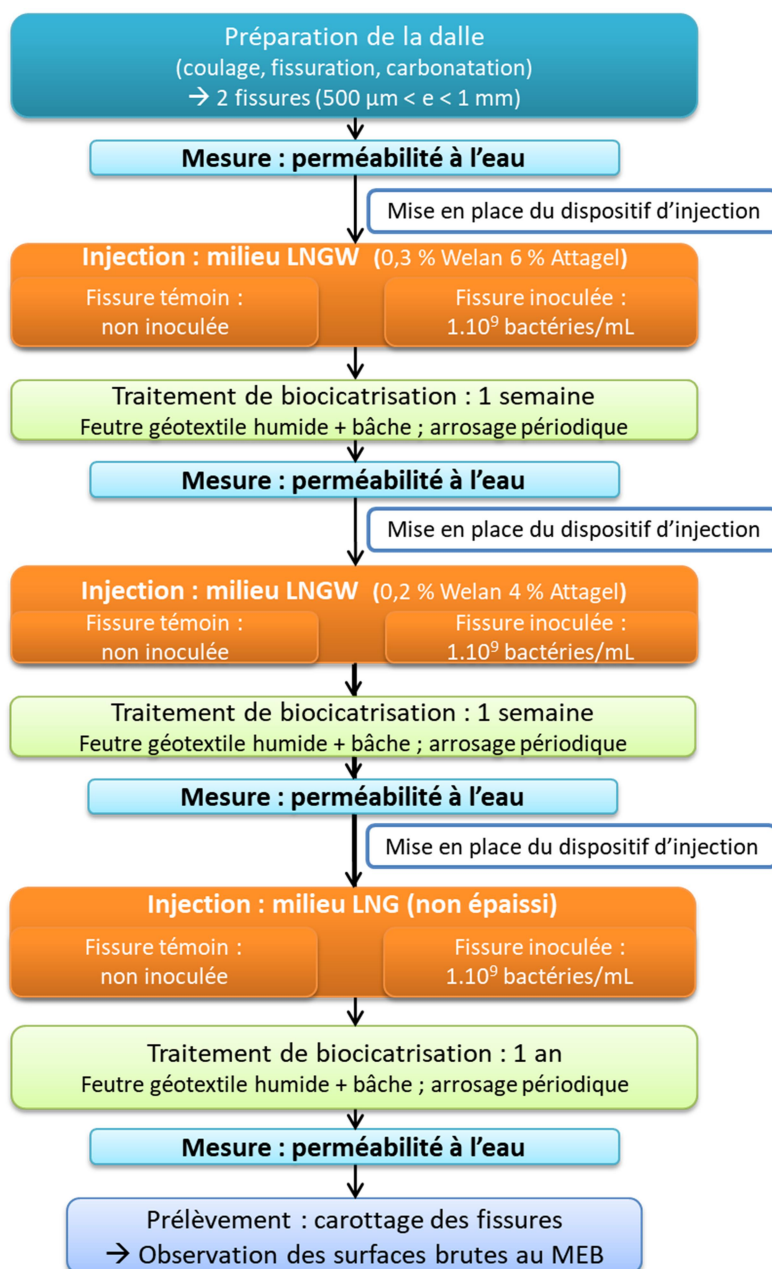


Figure 146 : Protocole schématisé de l'essai de biocicatrisation à l'échelle pilote.

La dalle de béton ne permettant pas de réaliser des mesures de débit d'air, le colmatage des fissures a été mesuré par le biais de leur perméabilité à l'eau. Le débit d'eau traversant la fissure par gravité est mesuré à l'aide d'un dispositif adapté (Figure 147), muni d'une réserve d'eau permettant de saturer la fissure en eau avant de réaliser la mesure. Le débit entrant est calculé via la variation de volume dans le dispositif au cours du temps, et l'eau sortant sous la fissure durant cet intervalle de temps est aussi récupérée dans un seau et le volume est mesuré dans une éprouvette graduée afin de calculer le débit sortant. La différence entre débit entrant et sortant est une indication de l'importance des biais de mesure, notamment l'absorption d'eau par la matrice cimentaire ou par les composés présents dans la fissure, l'écoulement latéral de l'eau dans la fissure, et les éventuelles fuites ou pertes lors de la mesure. Une mesure de la perméabilité à l'eau initiale est effectuée avant la première injection de milieu épaissi. La fissure est ensuite laissée à sécher 6 h puis préparée pour une nouvelle injection, mise en œuvre de la même manière que la première.

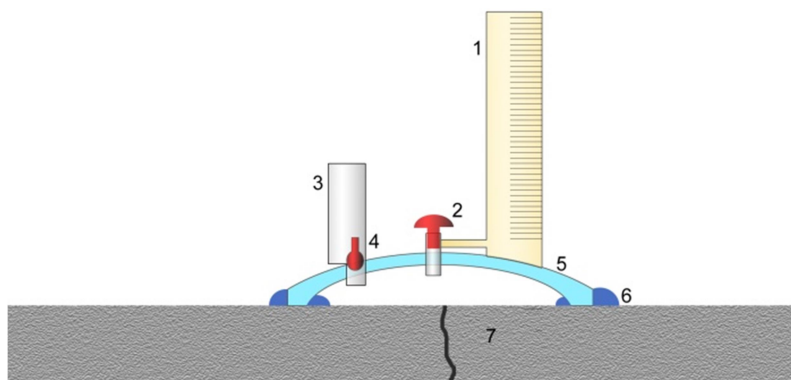


Figure 147 : Dispositif de mesure de la perméabilité à l'eau de la dalle. 1 - éprouvette graduée ; 2 - vanne ; 3 - réserve ; 4 - vanne ; 5 - socle étanche ; 6 - joint ; 7 - dalle fissurée.

7.3. Résultats et discussion

7.3.1. Suivi de l'essai de biocicatrisation

La fissuration de la dalle par traction des barres d'armature a permis de générer une grande fissure transversale de 1 mm d'ouverture environ, et une autre ramifiée ayant à peu près 400 μm d'ouverture. Ces fissures ne sont cependant pas du type souhaité. En effet, à cause de l'affaissement des barres sous leur propre poids lors du coulage du béton, leur tension par les vérins a conduit à un

redressement et donc à la flexion de la dalle elle-même : un effort de traction est imposé à la partie haute de la dalle, tandis que la partie basse est compressée. Les fissures ainsi produites ont donc un profil en « V » et sont trop fines pour être observées sur la face inférieure de la dalle malgré une ouverture importante sur la surface supérieure. Ces fissures restent des fissures réalistes mais leur forme est peu pratique pour l'injection de milieu épaissi et l'étude de la biocicatrisation. Pour cette raison, seule la plus grande fissure, dont l'ouverture est de 1 mm environ, sera utilisée pour réaliser les essais de biocicatrisation. Afin de pouvoir réaliser deux injections sans risque de contamination croisée entre elles, la fissure est divisée en deux en réalisant une carotte en son milieu.

La géométrie des fissures obtenues limite la diffusion verticale du milieu lors de l'injection : pour les deux fissures, le fluide tend à se diffuser latéralement tandis qu'il est impossible de lui faire traverser complètement la fissure. Le Tableau 37 présente le suivi de la perméabilité à l'eau des fissures étudiées au cours de l'essai de biocicatrisation.

Tableau 37 : Suivi de la perméabilité à l'eau des fissures au cours de l'essai de biocicatrisation à l'échelle pilote.

Débit entrant (mL/min)	Etat initial	1 ^{ère} injection (1 ^{ère} semaine de traitement)	2 ^{ème} injection (2 ^{ème} semaine de traitement)	Fin de traitement
Fissure de référence	540 (+/- 17)	103 (+/- 6)	12 (+/- 3)	21 (+/- 10)
Fissure inoculée	617 (+/- 29)	220 (+/- 10)	17 (+/- 3)	29 (+/- 1)

Dans la fissure de référence, le débit entrant est de 103 mL/min après une semaine de traitement, pour une valeur initiale de 540 mL/min, soit un taux de colmatage de 81 %. On observe en outre que le débit sortant de la fissure, initialement proche du débit entrant, n'est plus mesurable. En effet, à cause de l'absorption d'eau et de la résistance à l'écoulement apportés par le dépôt d'injection dans la fissure, il faut environ 30 secondes pour que les premières traces d'humidité apparaissent sous la dalle, contre quelques secondes avant la première injection de milieu épaissi, et il n'y a toujours pas d'écoulement au bout de 10 minutes, empêchant la mesure du débit. Le débit sortant est donc virtuellement nul. Il est possible de prolonger la mesure afin d'équilibrer les débits d'entrée et de sortie, mais cela sort du cadre de cette mesure. Le dépôt d'injection en surface ne présente aucun développement microbien visible à l'œil nu.

Dans la fissure inoculée, la première injection de milieu épaissi se traduit par une baisse du débit entrant de 617 à 220 mL/min, soit un taux de colmatage de 64 %. Comme cela a été observé dans la fissure non inoculée, le débit sortant devient virtuellement nul et ne peut être mesuré. Le temps de traversée de l'eau (délai entre le début du test de perméabilité à l'eau et l'observation de traces d'humidité sous la dalle) est de 30 secondes. Le dépôt d'injection en surface ne présente aucun développement de microorganismes visibles. Le colmatage de la fissure inoculée semble moins efficace que pour la fissure de référence, ce qui peut résulter d'un taux de remplissage inférieur.

La forte résistance à l'écoulement de la fissure ayant empêché de réaliser un remplissage complet de la fissure lors de la première injection, la viscosité du milieu épaissi utilisé pour la seconde injection a été réduite dans le but de faciliter l'injection et assurer un remplissage maximal de la fissure. La suspension utilisée pour la seconde injection a été épaissie avec 0,2 % de Welan et 0,4 % d'Attagel, au lieu de 0,3 % de Welan et 0,6 % d'Attagel. Toutefois, cette réduction de la viscosité ne suffit pas pour permettre de réaliser une injection de part en part de la fissure.

Après la seconde injection dans la fissure de référence, soit après deux semaines de traitement, le débit entrant est réduit à 12 mL/min environ, le taux de colmatage par rapport au débit initial est donc de 98 %. Le temps de traversée de l'eau est de 100 secondes. Le dépôt d'injection en surface ne présente pas de trace visible à l'œil nu d'un développement microbien.

La seconde injection dans la fissure inoculée se traduit par un résultat similaire : le débit entrant dans la fissure est réduit à 17 mL/min (+/- 3 mL/min), le taux de colmatage est donc de 97 % par rapport au débit initial. Le temps de traversée de l'eau est de 100 secondes environ, il est donc identique au temps de traversée mesuré en l'absence de bactéries.

Au cours de la période d'une année durant laquelle la dalle fissurée est maintenue humide, le feutre géotextile assure efficacement l'humidification de la dalle. En effet, l'arrosage du feutre destiné à maintenir la fissure humide n'est effectué qu'une fois par mois. L'utilisation d'un feutre géotextile épais couvert d'une bâche permet donc, sur un échantillon de taille suffisante, de maintenir les fissures humides durant une période prolongée et permet de réduire le nombre d'opérations de maintenance à effectuer lors du traitement de biocicatrisation. Après un an de traitement, débit entrant est de 21 mL/min pour la fissure témoin et de 29 mL/min pour la fissure inoculée ; le taux colmatage des fissures en fin de traitement est donc de 97 % et de 95 %, respectivement. On constate une faible augmentation du débit d'eau entrant (moins de 20 mL/min, pour une baisse de débit entrant comprise entre 500 et 600 mL/min), qui est cohérente avec la légère augmentation de

perméabilité observée lors des tests de lessivage réalisés au cours des essais de biocicatrisation sur éprouvettes. Le dépôt d'injection est donc résistant au lessivage même après un an, et présente donc une bonne durabilité à long terme.

7.3.2. Analyse du dépôt d'injection

La fissure de référence a été ouverte afin d'observer ses surfaces internes. L'observation de la fissure à l'œil nu montre les zones de répartition du dépôt d'injection (Figure 148). On peut constater que la quantité de dépôt est très importante sur les cinq premiers centimètres de profondeur (zone a), puis rapidement plus faible au fur et à mesure que la profondeur augmente (zones b et d). Sur les derniers centimètres de la fissure, la quantité de dépôt présente est faible, voire nulle. On observe une forte concentration de dépôt à mi-hauteur de la fissure (zone c), qui est probablement causée par la barre d'armature : la barre d'armature étant à l'origine de la fissuration, la fissure est probablement plus large à ce niveau.

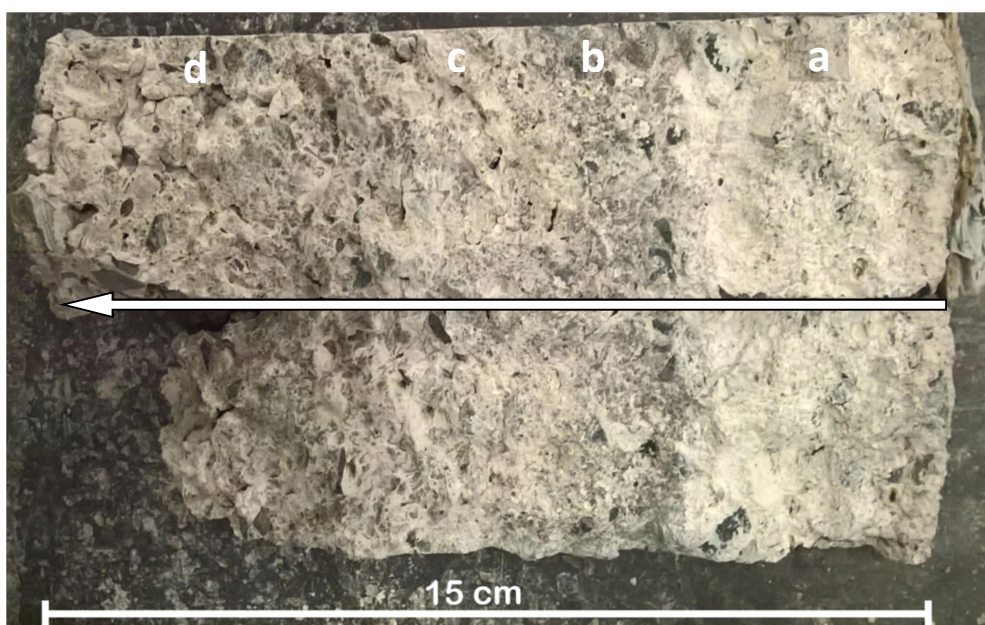


Figure 148 : Carotte de la fissure de référence à l'issue de l'essai de biocicatrisation à l'échelle pilote. Flèche : sens d'injection.

Observée au MEB (Figure 149), le dépôt d'injection de la fissure de référence est essentiellement constitué de tapis argileux, d'apparence similaire à celui observé dans les fissures témoins abiotiques des essais de biocicatrisation en conditions contrôlées. Le dépôt semble cependant moins riche en particules et en précipités, et de larges surfaces sont constituées uniquement d'argiles (Figure 149, A). Des hyphes de champignons et des traces de biofilm peuvent être parfois observées (Figure 149, B) mais restent rares. Cette homogénéité est vraisemblablement due au lessivage provoqué par les mesures de perméabilité, qui nécessitent au moins 100 mL d'eau. On peut observer par endroits des amas de carbonate de calcium en forme de menhirs de plusieurs dizaines de micromètres de long, émergeant de sous le dépôt d'injection. La forme et la position de ces cristaux, observée au cours d'essais précédents (Figure 88), permet de les identifier comme provenant de l'autocicatrisation du béton.

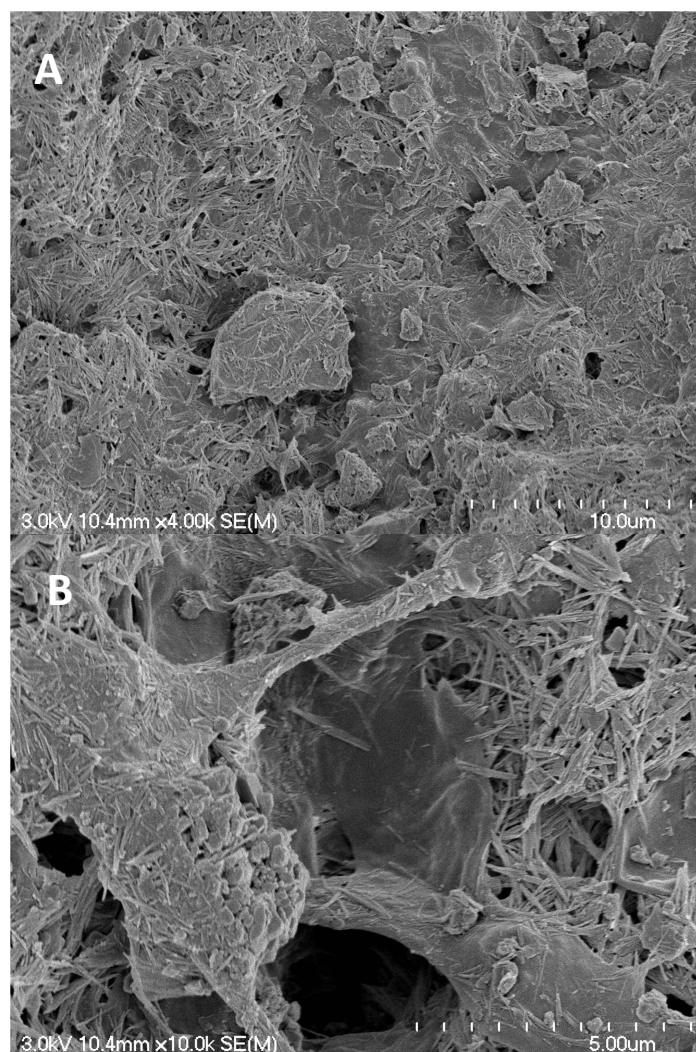


Figure 149 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein d'un échantillon de référence après traitement dans une dalle fissurée.

L'observation au MEB de la fissure inoculée montre que le dépôt d'injection est d'apparence similaire à celui observé dans la fissure de référence (Figure 150, A). On observe toutefois de nombreuses empreintes de 1 à 2 μm de longueur dans le dépôt argileux, dont la forme correspond à celle de bacilles (Figure 150, B). Ces traces peuvent être les empreintes de bacilles ayant été introduites avec la suspension épaissie ou s'étant développées à la surface du dépôt, puis ayant été emportées lors de la mesure de perméabilité à l'eau.

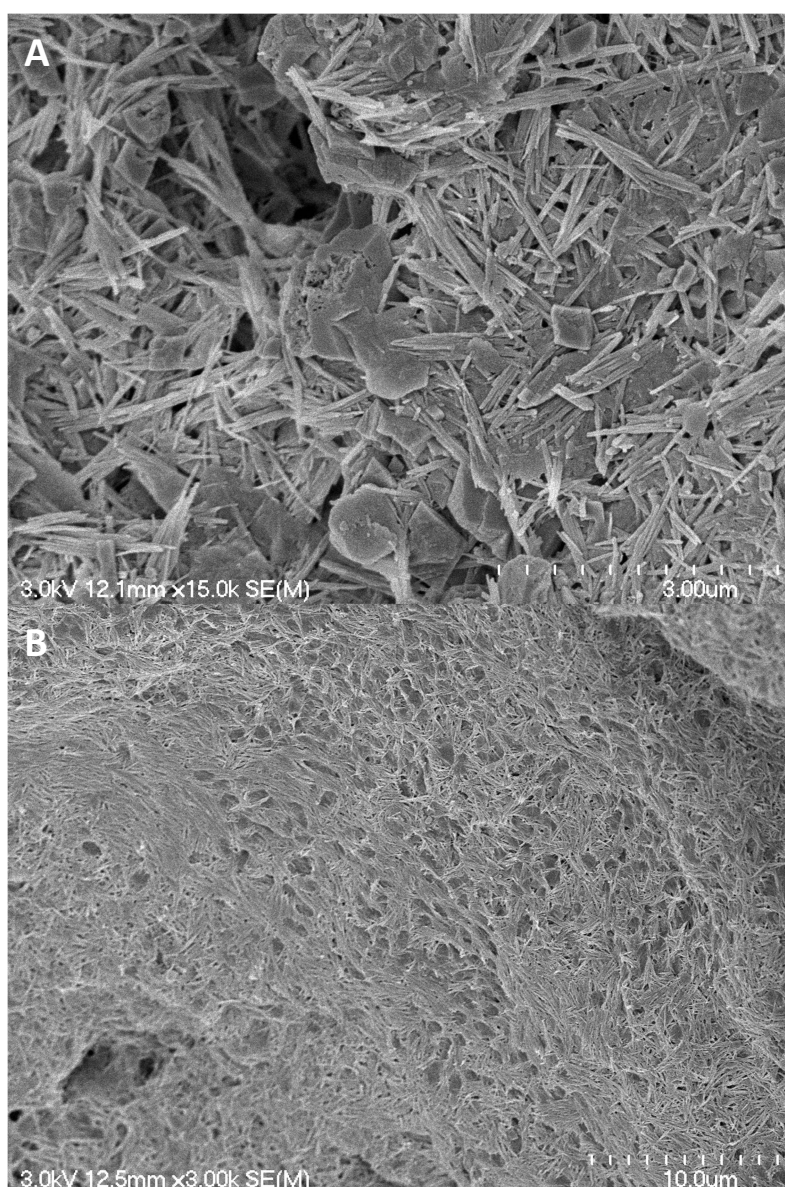


Figure 150 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein d'un échantillon inoculé après traitement dans une dalle fissurée. A – détail du dépôt d'injection ; B – zone de dépôt avec empreintes bactériennes.

On observe en outre des objets de forme similaire à des bacilles ou à des cocci (Figure 151), de taille comprise entre 0,5 et 2 μm , dont la surface est couverte de cubes de taille comprise entre 50 et 200 nm. L'analyse par EDS de ces objets montre une forte teneur en calcium, en oxygène et en carbone, pouvant correspondre à un mélange de carbonate de calcium et de matière organique. Il peut donc s'agir de bactéries ayant réalisé la biominéralisation et s'étant enveloppées d'une fine gangue de carbonate de calcium. Il n'a en revanche pas été possible d'observer dans cet échantillon d'amas de carbonate de calcium biogénéré présentant des empreintes de bactéries comme cela a été observé à l'issue des essais de biocicatrisation *in vitro* et *in situ*.

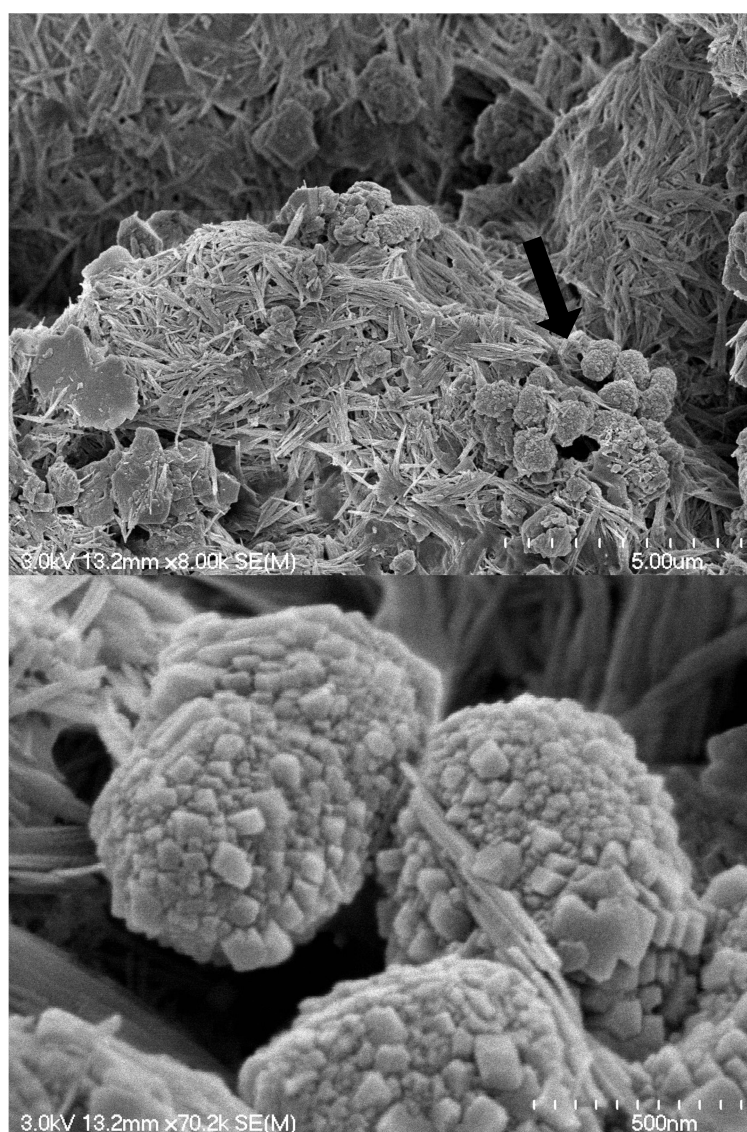


Figure 151 : Observation au MEB du dépôt d'injection au sein d'un échantillon inoculé après traitement dans une dalle fissurée. Flèche : bactéries enveloppées de CaCO_3 .

Ces observations mettent donc en évidence une activité de biominéralisation au sein de la fissure inoculée avec la bactérie d'étude. Toutefois, la quantité de carbonate de calcium produit est insuffisante pour contribuer au colmatage des fissures. Le processus biominéralisation pourrait être amélioré par des apports réguliers de nutriments et de précurseurs (par injection du milieu LNG), non réalisés dans cette expérimentation, et par le maintien d'une humidité suffisante au niveau de la dalle pour permettre la réalisation du processus de biocicatrisation. En effet, la biocicatrisation peut être limitée par l'apport d'eau dans les couches profondes de la fissure. Si la face supérieure de la dalle est recouverte d'un géotextile humide apportant de l'eau dans la fissure, la face inférieure est exposée à l'air ambiant et peut donc sécher. Il est donc possible que la fissure sèche par le bas et ne soit humide que sur les premiers centimètres. Pour éviter cela, la face inférieure de la fissure peut être couverte d'un géotextile humide et/ou d'une bâche pour éviter qu'elle ne sèche.

7.4. Conclusion

L'essai de biocicatrisation réalisé sur une dalle de béton a permis d'aborder la mise en œuvre concrète du procédé de biocicatrisation mis au point au cours de cette thèse, ainsi que de tester des méthodologies permettant de réaliser et de suivre des essais de biocicatrisation à l'échelle pilote.

Les injections successives de suspension épaissie non inoculée dans des fissures de 1 mm d'ouverture environ ont conduit à une diminution de 97 % du débit d'eau entrant dans la fissure par rapport au débit initial au bout d'un an de traitement, en ralentissant fortement la vitesse de circulation de l'eau dans les fissures. Des résultats comparables ont été obtenus après injection de la suspension épaissie inoculée, avec une réduction de 95 % du débit d'eau entrant par rapport à la valeur initiale. L'observation au MEB de l'intérieur de la fissure de référence a permis de mettre en évidence une quantité importante de dépôt d'injection sur les premiers centimètres, dont l'épaisseur diminue avec la profondeur. Ce dépôt est constitué d'un tapis argileux provenant des constituants du milieu épaissi, avec la présence de quelques hyphes de champignons et de traces de biofilm. L'observation au MEB de la surface des fissures inoculées montre des traces de la présence de bactéries sous la forme d'empreintes laissées dans le dépôt argileux, mais très peu de CaCO_3 d'origine biologique. Toutefois, on note la présence de bactéries dont la surface est recouverte d'une fine gangue de carbonate de calcium formé par biominéralisation.

Au cours de cet essai, les fissures n'ont pas été soumises à des injections périodiques de milieu LNG, ce qui a probablement réduit l'efficacité du traitement. L'efficacité de la biocicatrisation pourrait être améliorée par des injections périodiques de milieu LNG, apportant les nutriments et précurseurs nécessaires à la biominéralisation.

L'aspect technologique du procédé de biocicatrisation a été également abordé au cours de cet essai. En effet, cet essai a permis de mettre en œuvre une méthode innovante d'expérimentation à l'échelle pilote, et de la tester au cours d'un essai de biocicatrisation. La réalisation de l'essai de biocicatrisation d'une dalle de béton a montré qu'il est possible, à l'aide d'un dispositif simple, d'injecter le milieu épaissi dans des ouvrages en matériaux cimentaires à taille réelle. Ce retour d'expérience a aussi permis d'ouvrir des perspectives d'améliorations de la technique par la modification de la dalle de béton, qui pourront être développées lors de travaux ultérieurs. En outre, l'utilisation de feutre géotextile a permis de maintenir une humidité suffisante dans ces fissures pour une période prolongée avec un investissement et un entretien minimaux. Cette technique d'humidification peut être un atout pour la mise en œuvre de bioprocédés sur des volumes importants de matériaux cimentaires. Il s'agit du premier essai de biocicatrisation de matériaux cimentaires ayant été réalisé à l'aide d'un dispositif spécialement conçu à l'échelle pilote. En plus d'avoir démontré qu'il est possible de précipiter du carbonate de calcium d'origine bactérienne à l'intérieur d'ouvrages à cette échelle, cet essai a permis de mettre au jour des voies d'amélioration de la méthode expérimentale mais aussi du procédé de biocicatrisation lui-même, pour faciliter sa mise en œuvre et améliorer son efficacité.

CHAPITRE 8.

Conclusions et perspectives

La biocicatrisation des matériaux cimentaires est un procédé de réparation des fissures n'utilisant pas de composés polluants et permettant une réparation plus durable que les composés synthétiques actuellement utilisés. Toutefois, les fissures sont exposées à de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques pouvant altérer la survie des bactéries ainsi que leur capacité à produire du carbonate de calcium en quantités suffisantes. De plus, la géométrie des fissures impose d'adopter des techniques spécifiques pour optimiser l'injection et le maintien des bactéries dans celles-ci. Malgré les progrès réalisés par la recherche pour étudier et améliorer son potentiel, cette méthode de réparation doit donc être encore optimisée pour permettre une utilisation commerciale.

Ce projet vise à étudier et améliorer les conditions de biocicatrisation en conditions réelles à travers la création d'une méthode d'exobiocicatrisation par injection : les bactéries sont cultivées dans un milieu épaissi favorisant leur injection au sein de la fissure et leur survie face aux agressions du milieu extérieur.

La première phase de cette thèse a consisté à modifier les propriétés rhéologiques du milieu de culture bactérienne pour favoriser l'injection dans des fissures de 150 à 500 μm . La dispersion de Welan et d'Attagel dans le milieu LNG a conduit à l'obtention d'une suspension rhéofluidifiante et thixotrope, propriétés recherchées pour faciliter l'injection et éviter le drainage post-injection. Les essais d'injection de la suspension dans des éprouvettes de mortier fissurées a permis de sélectionner la suspension épaissie à l'aide de 0,3 % de Welan et 6 % d'Attagel. Cette suspension est un fluide pseudoplastique dont la rhéologie correspond au modèle d'Ostwald, avec un indice d'écoulement égal à 0,191 et un indice de consistance égal à 7,31. L'observation au MEB de l'intérieur des fissures révèle que la suspension forme en séchant un dépôt solide essentiellement composé d'argile, ayant une faible épaisseur mais formant des crêtes et des ponts entre les parois de la fissure.

L'objectif de la seconde phase de cette thèse a été de vérifier la compatibilité de ce milieu épaissi avec la croissance de la souche bactérienne *Bacillus pseudofirmus* et la production de carbonate de calcium. Des essais de croissance bactérienne en conditions contrôlées ont été réalisés, au cours desquels l'impact de l'épaississement du milieu, de la préparation des inoculats bactériens et de la température sur la bioproduction de CaCO_3 ont été étudiés. Ces essais ont permis d'optimiser la

composition du milieu de culture ainsi que les inoculats bactériens, afin de maximiser la bioproduction de CaCO_3 par la souche bactérienne d'étude.

Enfin, la troisième et dernière phase de cette thèse a visé à mettre en application le procédé de biocicatrisation par le biais d'injections de milieu épaissi inoculé dans des éprouvettes de mortier fissurées et suivre la production de carbonate de calcium dans les fissures. Afin d'obtenir des données complètes sur les facteurs influençant la biocicatrisation et sur l'applicabilité de la méthode en conditions réelles, les essais ont été menés en conditions contrôlées mais aussi en milieu extérieur.

Cette thèse a permis de concevoir un système innovant pour la biocicatrisation des matériaux cimentaires fissurés à l'échelle pilote, et de mieux identifier les obstacles vers la mise au point d'une méthode d'exobiocicatrisation fiable, efficace et économiquement viable.

8.1. Formulation d'un milieu épaissi

Les essais de rhéologie réalisés ont conduit à la formulation d'une suspension rhéofluidifiante et thixotrope, en réalisant un mélange de gomme Welan et d'argile Attagel. Le Welan et l'Attagel sont deux épaississants agissant en synergie pour produire un fluide extrêmement rhéofluidifiant et thixotrope. Le milieu ainsi conçu est fluide lorsqu'il est soumis à un fort cisaillement comme lors de l'injection, mais regagne progressivement sa viscosité d'origine. Le choix de ces épaississants répond en outre à des considérations pratiques pour une utilisation commerciale de l'exobiocicatrisation, ceux-ci devant être :

- Peu coûteux et faciles d'utilisation pour permettre un usage à échelle réelle ;
- Biocompatibles, non polluants et sans danger pour l'opérateur.

La suspension épaissie obtenue est un fluide rhéofluidifiant et thixotrope suivant la loi d'Ostwald, mais se comportant comme un fluide de Hershel-Bulkley après une période de repos de plusieurs heures. Le mélange Welan-Attagel est en effet capable de former un pseudo-gel après un repos prolongé, c'est-à-dire un gel fragile qui peut être déstructuré et se reformer à volonté sans aucune altération de ses propriétés. Le comportement rhéofluidifiant important de cette suspension permet de diminuer fortement sa viscosité en la soumettant à une agitation. En effet, des suspensions contenant 4, 5, 6, 7 ou 8 % d'Attagel voient leur viscosité divisée par respectivement 649, 824, 957, 1079 et 1152 lorsqu'elles sont agitées à un taux de cisaillement de 500 s^{-1} après une phase de repos.

Les concentrations en Welan et en Attagel peuvent être adaptées pour ajuster la viscosité de la suspension et personnaliser la suspension en fonction des besoins de l'opérateur. Il est en effet possible, avec une concentration en Welan comprise entre 0,2 et 0,4 % et une concentration en Attagel comprise entre 4 et 8 %, de faire varier la viscosité de la suspension au repos de 15,2 à 125 Pa.s.

En réalisant des essais d'injection de milieu dans des fissures d'ouverture variées, nous avons conclu que la suspension idéale pour réaliser l'injection de milieu dans des fissures d'ouverture comprise entre 150 et 500 μm est composée à 0,3 % de Welan et 6 % d'Attagel, puisque cette suspension peut être injectée efficacement dans des fissures d'ouverture comprise entre 140 et 800 μm tout en évitant le drainage post-injection. Le dépôt d'injection formé à l'intérieur des fissures est essentiellement constitué d'Attagel, qui forme un film parcouru de crêtes. Ce dépôt est insoluble et résistant au lessivage et peut donc contribuer à son colmatage. Cette suspension présente donc des propriétés rhéologiques et physico-chimiques adaptées, et peut être soumise à des essais de croissance bactérienne pour évaluer et optimiser la production de CaCO_3 dans le milieu épaissi.

8.2. Croissance bactérienne en milieu épaissi

Les essais de croissance bactérienne ont révélé que *Bacillus pseudofirmus* adapte sa morphologie à la présence de nitrate de calcium, abandonnant sa forme de bacille pour adopter une morphologie en cocci, ceux-ci étant regroupés en tétrades. Cette réponse au stress n'est pas constante, et engendre par conséquent une forte variabilité des résultats, en particulier de la production de carbonate de calcium. En outre, les essais réalisés à 20°C ont montré que la température affecte fortement la productivité en carbonate de calcium et la répétabilité des résultats par rapport aux essais menés à 30°C. Le protocole des essais de croissance bactérienne a donc été progressivement modifié, afin de pallier ces obstacles.

Plusieurs modifications successives de ce protocole ont permis d'aboutir à une méthode assurant une répétabilité et une productivité maximales lors des essais :

- Les inoculats des précultures sont réalisés à l'aide de cryotubes de bactéries sous la forme « cocci » dans un milieu contenant du milieu Nutrient Broth et du nitrate de calcium (milieu NBN), au lieu de la forme « bacille » dans du milieu Nutrient Broth tamponné à pH 9,6 ;

- Les précultures sont réalisées durant 40 h dans le milieu NBN, à 30°C ;
- 20 g/L de gluconate de calcium sont ajoutés au milieu, constituant une source supplémentaire de calcium et de matière organique ;
- Le résidu solide en fin de culture est récupéré par centrifugation plutôt que par filtration pour un meilleur rendement.

La morphologie bactérienne subit des changements suite à l'ajout de Welan et d'Attagel, puisque l'on observe une tendance accrue à la formation de clusters et la présence de plusieurs morphologies coexistant dans une même culture. Cette diversité de morphologies s'explique par une agitation moins efficace due à la viscosité importante du milieu épaissi. Cela se traduit par des gradients de conditions de culture différentes au sein de l'erenmeyer, entraînant des modifications de la morphologie des bactéries. Cela étant, ces changements n'ont aucun impact sur la production de carbonate de calcium et ne sont donc pas considérés comme un obstacle.

Les modifications de protocole appliquées ont permis d'optimiser les conditions de culture de manière à maximiser la production de carbonate de calcium dans un milieu épaissi et d'assurer une répétabilité maximale des essais de croissance bactérienne. Ces différentes étapes successives ont permis de sélectionner le milieu LNGW à base d'extrait de levure ($c = 3$ g/L), de lactate de calcium ($c = 75$ g/L), de nitrate de calcium ($c = 47$ g/L), de gluconate de calcium ($c = 20$ g/L), de Welan (0,3 %), et d'Attagel (6 %). La croissance de *B. pseudofirmus* dans ce milieu a permis de produire 25 g/L (+/- 3 g/L) de carbonate de calcium en 35 jours dans le milieu LNGW à 20°C. L'ajout d'épaississants semble favoriser la consommation de lactate et la production de CaCO_3 par les bactéries. En effet, la consommation de lactate en milieu épaissi est totale au bout de 20 jours environ, tandis qu'elle est de 80 % sans épaississants.

8.3. Essais de biocicatrisation

Le milieu épaissi mis au point au cours des essais de rhéologie et le protocole expérimental de culture bactérienne optimisé au cours des essais de croissance bactérienne ont été employés pour réaliser des essais de biocicatrisation sur des échantillons de mortier fissurés. En premier lieu, le milieu épaissi inoculé avec *B. pseudofirmus* a été injecté dans des éprouvettes de mortier fissurées et carbonatées, qui ont été maintenues dans un environnement contrôlé durant seize semaines. Ce premier essai a pour objectif de déterminer le potentiel de biocicatrisation en conditions contrôlées et

de caractériser le dépôt formé à l'intérieur des fissures. Dans un deuxième temps, un essai de biocicatrisation identique a été réalisé en milieu extérieur, dans un environnement où la température et les contaminations biologiques ne sont pas contrôlées, afin d'étudier l'impact de l'environnement sur l'efficacité de la biocicatrisation. Enfin, le traitement de biocicatrisation a été appliqué sur une dalle de béton fissurée et carbonatée, afin d'évaluer l'applicabilité de la méthode à l'échelle pilote.

Les essais de biocicatrisation en milieu contrôlé ont révélé que le dépôt solide formé par l'argile lors du séchage du milieu épaissi après l'injection contribue au colmatage des fissures, réduisant l'ouverture apparente des fissures de 50 à 100 μm par injection. En l'absence de bactéries, ce dépôt n'évolue pas au cours du traitement, et conserve la même structure et composition qu'en début de traitement. En effet, le milieu épaissi forme au séchage un dépôt d'injection argileux insoluble, résistant au lessivage et à une pression de 5 bar.

Après 4 semaines de traitement, soit deux injections de milieu LNGW inoculé, l'activité bactérienne semble avoir un impact sur le colmatage des fissures bien que le milieu LNGW contribue significativement à la réduction de l'ouverture apparente des fissures. En revanche, il n'y a pas de formation de biofilm ou de précipitation observable de CaCO_3 dans les fissures, principalement à cause d'un manque d'humidification des fissures. En revanche, un traitement de 16 semaines permet d'obtenir une réduction d'ouverture apparente sensiblement plus importante par rapport aux témoins abiotiques pour les grosses fissures de l'ordre de 300 μm , pour lesquelles le colmatage est de l'ordre de 90 %. Pour des fissures de l'ordre de 230 μm , il est difficile de mettre en évidence l'effet de l'activité bactérienne lorsque deux injections de milieu épaissi ont été réalisées, dans la mesure où le dépôt d'Attigel réduit fortement l'ouverture apparente des fissures. L'observation au MEB et l'analyse par EDS des sections polies des fissures permet d'identifier de nombreux amas de CaCO_3 à la surface et à l'intérieur du dépôt d'injection, contribuant au colmatage de la fissure. L'observation directe du dépôt d'injection au MEB permet de définitivement identifier ce CaCO_3 comme étant d'origine biologique. En effet, les cristaux observés sont formés au sein du dépôt argileux et présentent à leur surface des empreintes de forme et de taille similaire à la souche bactérienne d'étude. Enfin, ce dépôt est résistant au lessivage et à une pression de 5 bar. Les résultats obtenus ont également montré que lorsque la biocicatrisation est réalisée en conditions contrôlées, une seule inoculation bactérienne est suffisante pour assurer l'efficacité du procédé de biocicatrisation.

L'essai de biocicatrisation réalisé *in situ* a présenté une forte variabilité des résultats, et n'a pas permis de déterminer si l'activité de la bactérie d'étude a eu un impact sur la perméabilité à l'air des fissures étudiées. Des preuves du processus de biocicatrisation ont toutefois pu y être observées.

En effet, il a été possible d'observer au MEB des amas de carbonate de calcium d'origine biologique, présentant une morphologie identique à ceux observés dans les fissures inoculées avec *B. pseudofirmus* au cours des essais de biocicatrisation en conditions contrôlées. Les cristaux observés sont formés à la surface du dépôt d'injection et présentent des empreintes de bactéries, une morphologie absente dans les échantillons non inoculés. Ce dépôt présente une durabilité importante puisqu'il est résistant à des pressions allant jusqu'à 5 bar ainsi qu'au lessivage par de l'eau.

Les amas de CaCO_3 ayant été observés sont localisés et ont une structure généralement poreuse, ce qui peut améliorer l'efficacité du colmatage, d'une part en augmentant le volume de dépôt formé par rapport à la masse de CaCO_3 produite, et d'autre part en favorisant la formation d'amas de plus grande taille, qui contribuent à la formation de ponts entre les parois de la fissure.

Enfin, un essai de biocicatrisation a été réalisé à l'échelle pilote, sur une dalle de béton de 1 m de côté et 15 cm d'épaisseur préalablement fissurée et carbonatée, afin d'identifier les impacts du changement d'échelle sur la mise en œuvre de la méthode de biocicatrisation. Cet essai a permis la mise au point d'une technique innovante pour générer des fissures réalistes au sein d'échantillons de grande taille, en employant un cadre de traction équipé de vérins. Bien que cet essai nécessite des améliorations pour optimiser le procédé de biocicatrisation, les résultats obtenus sont encourageants. En effet, l'observation au MEB de la fissure inoculée a révélé la présence de cellules bactériennes dont la surface est recouverte d'une fine gangue de carbonate de calcium produite par biominéralisation. Cet essai est une source d'informations importantes pour la mise au point de nouvelles méthodes d'étude de la biocicatrisation à l'échelle pilote, en particulier pour la génération de fissures d'ouverture et de forme contrôlées. En outre, l'utilisation d'un feutre géotextile épais comme vecteur et réserve d'eau sur le matériau fissuré s'est révélé être une méthode efficace pour maintenir la fissure humide, condition nécessaire pour maintenir l'activité bactérienne nécessaire à la biocicatrisation.

8.4. Perspectives de travail futures

Ce travail de thèse a ouvert des perspectives intéressantes pour l'utilisation commerciale de l'exobiocicatrisation en mettant à jour les atouts de cette technique et les points pouvant être améliorés pour sa mise en œuvre en conditions réelles :

- Le calcul du potentiel de biocicatrisation, basé sur la concentration en ions calcium des milieux de culture bactérienne utilisés, a démontré la nécessité de pratiquer des injections régulières dans les fissures. En effet, une seule injection n'apporte que peu d'ions calcium dans la fissure, des réinjections périodiques sont donc nécessaires. Cette contrainte devra être prise en compte pour les essais de biocicatrisation futurs. Le procédé devra donc être conçu pour permettre les réinjections de milieu, qu'elles soient manuelles ou automatisées.

- Bien que les essais de croissance bactérienne aient démontré que l'épaississement du milieu améliore la production de carbonate de calcium à 20°C et diminuent la variabilité des résultats, les essais de biocicatrisation ont montré que l'exposition au milieu extérieur génère des contraintes très importantes pour l'activité bactérienne (température, humidité, contaminations...). L'utilisation d'un consortium de bactéries indigènes capables de réaliser la biominéralisation, plutôt qu'une culture pure (axénique), pourrait fortement améliorer le potentiel de biocicatrisation. L'emploi d'un consortium de microorganismes au lieu d'une souche pure est en effet de plus en plus répandu en biotechnologies, car permet de rendre la méthode plus résistante aux contaminations et aux variations de conditions environnementales. De plus, ce type de culture est moins coûteux à produire, ce qui le rend plus adapté à une utilisation commerciale [194].

- L'utilisation d'enzymes au lieu de bactéries peut être une voie de recherche intéressante, car une solution d'enzymes et de précurseurs de biominéralisation ne requiert pas de conditions de croissance spécifiques. De plus, l'enzyme peut être améliorée pour être efficace dans les conditions de réparation (pH élevé, température moyenne). Toutefois, cette perspective requiert un travail à long terme pour identifier, isoler, produire et améliorer les enzymes adéquates.

- Les essais de biocicatrisation réalisés *in situ* sur des éprouvettes de mortier fissurées ont montré qu'il était difficile de réguler l'humidification d'échantillons de petite taille, car peuvent contenir peu de réserves d'eau. La dalle de béton, plus représentative des conditions réelles d'utilisation de la méthode de par son grand format, peut être optimisée pour étudier le traitement d'ouvrages en béton.

- Les interactions argile-bactéries sont complexes et peuvent différer selon l'argile ou le microorganisme utilisés. Dans la perspective de l'utilisation d'une autre souche que *B. pseudofirmus* ou de son utilisation avec d'autres microorganismes, il serait intéressant d'envisager l'usage des sépiolites ayant été testées au cours des essais de rhéologie, celles-ci ayant montré des propriétés rhéologiques intéressantes en mélange avec le Welan ou le xanthane.

- L'utilisation actuelle d'adhésif aluminium et/ou de mastic de polyuréthane pour éviter les fuites lors de l'injection est nécessaire pour la bonne conduite des expérimentations, mais ces composés polluants augmentent l'impact environnemental du procédé de biocicatrisation. Dans l'optique d'un usage commercial, il convient donc de les remplacer par des composés non polluants tels que les bio-colles, qui sont des adhésifs biosourcés et biodégradables. La bio-colle utilisée doit présenter une bonne adhérence au matériau et une résistance en tension importante pour ne pas céder lors de l'injection du milieu épaissi dans les fissures. Un mélange entre un gélifiant (alginate, Agar, chitosane) et des protéines (collagène, gluten) pourrait présenter de telles propriétés pour un coût de production minimal.

- Les méthodes d'analyses actuelles permettent de suivre et d'étudier le processus de biocicatrisation, mais d'autres techniques peuvent être employées pour une caractérisation plus poussée. L'observation des fissures par tomographie est une méthode non destructrice qui peut présenter des atouts non négligeables, mais qui nécessite d'adapter les dimensions des échantillons. Le marquage moléculaire des précurseurs de biominéralisation ou du matériau lui-même pourrait être intéressant pour identifier l'origine des composés observés au MEB.

- Pour finir, le défi le plus important de la biocicatrisation est l'approvisionnement en nutriments. Bien qu'il soit possible de réaliser des réinjections périodiques de milieu nutritif dans les fissures, cela multiplie le coût de la méthode et n'est donc pas envisageable pour un usage commercial. L'eau et les nutriments étant continuellement consommés ou perdus, un approvisionnement constant est nécessaire, d'autant qu'un apport en excès est difficile à mettre en œuvre, génère des fuites et favorise le développement de microorganismes extérieurs. Il est envisageable de s'inspirer du principe de fonctionnement du chemostat en connectant un réservoir de milieu nutritif à la fissure par l'un des ports d'injection, pour assurer un remplissage permanent de la fissure sans nécessiter d'interventions supplémentaires.

- Une utilisation commerciale impliquant une application en chantier par du personnel non formé aux techniques de microbiologie, il pourrait être intéressant de conditionner les bactéries sous une forme facilitant son transport et son emploi entre sa sortie des bioréacteurs et son injection. La préparation d'inocula secs sous forme de flocons ou de granules pourrait être une voie de développement intéressante.

- Cette technique d'exobiocicatrisation emploie des composés peu coûteux et la facilité de préparation et d'emploi du milieu épaissi contribue à limiter les coûts de mise en œuvre. Les interventions répétées constituent toutefois un certain surcoût, et doivent être minimisées à l'aide des améliorations proposées précédemment. Bien qu'elle puisse être plus coûteuse que l'application de résines époxy, l'exobiocicatrisation bénéficie d'une plus-value non négligeable, grâce à la durabilité du carbonate de calcium dans le temps, ainsi que par l'image éco-responsable qu'elle porte.

CHAPITRE 9.

Annexes

Annexe 1. Analyses chromatographiques

L'analyse de la teneur en lactate et en gluconate dans les essais de croissance bactérienne a été réalisée par chromatographie ionique. Comme cela a été observé par Ducasse-Lapeyrosse (2014) [5], la dégradation bactérienne du lactate de calcium peut s'accompagner de la formation de produits de dégradation intermédiaires, notamment le propionate, le formiate et l'acétate (Figure 152). La présence de ces composés est un obstacle à l'analyse des chromatogrammes. En effet, l'acétate a un temps de rétention très légèrement supérieur au lactate (Figure 153, C, temps de rétention 6,954), et les pics de chromatographie des deux composés peuvent se chevaucher partiellement, ce qui nuit à la quantification du lactate. Le formiate et le propionate ont un temps de rétention supérieur de plus d'une minute au lactate et n'apparaissent pas sur les chromatogrammes obtenus, ils ne posent donc pas problème pour la quantification du lactate.

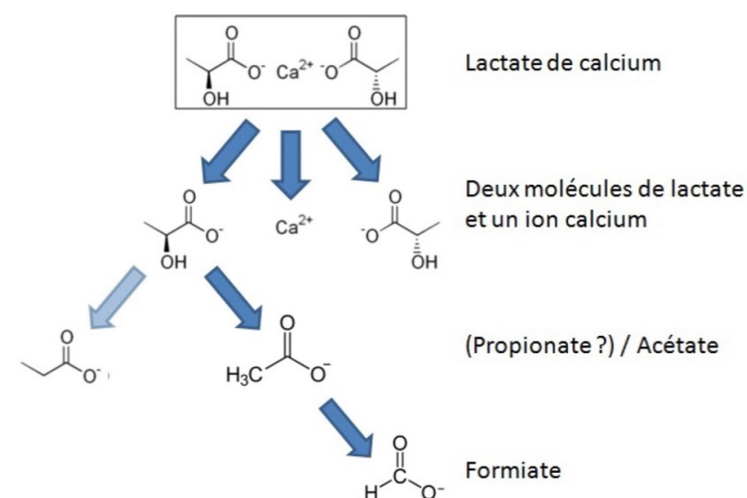


Figure 152 : Potentielles voies de décomposition du lactate de calcium.

Le gluconate a un temps de rétention légèrement inférieur au lactate et présente des pics de faible intensité par rapport au lactate. Il est donc difficile à quantifier, surtout à faibles concentrations. En outre, le pic de gluconate est parfois pollué par la présence de composés non identifiés, ce qui peut être diagnostiqué par l'apparition d'un pic secondaire ou d'une bosse dans le pic du gluconate (Figure 153, C). Lorsque cela arrive, il est alors impossible de quantifier le gluconate avec certitude. La

présence d'impuretés venant amplifier le pic du gluconate sans être détectées (c'est-à-dire en concentrations trop faibles pour faire apparaître une bosse ou un pic sur le pic du gluconate) peut expliquer certaines valeurs aberrantes obtenues au cours des essais. En effet, certains suivis montrent une augmentation de la teneur en gluconate au cours de l'essai, jusqu'à des valeurs supérieures à la valeur initiale, ce qui est impossible. L'amplification du pic par d'autres composés expliquerait ces valeurs. La quantification du gluconate dans les échantillons est donc trop imprécise pour être effectuée. Seule une appréciation qualitative sera donnée, précisant s'il y a eu une consommation partielle ou totale du gluconate au cours des différents essais de croissance bactérienne.

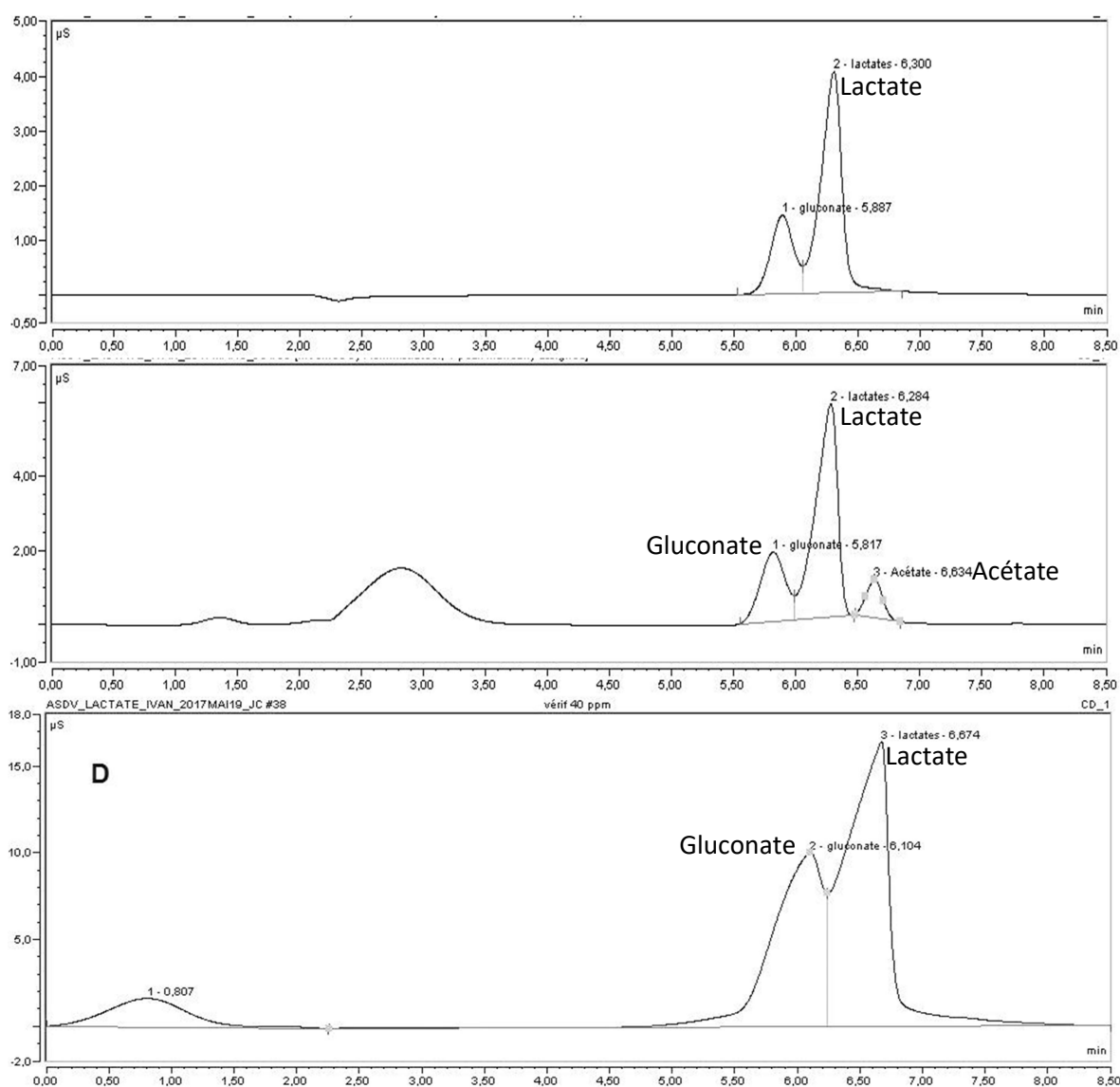


Figure 153 : A – Pics du lactate et du gluconate en début de culture ; B – Présence de pics parasites multiples en cours d'essai ; C – Pollution du gluconate par un pic parasite.

Annexe 2. Analyses thermogravimétriques

La présence d'Attigel dans les milieux de culture épaissis peut causer des biais dans la détermination de la production de carbonate de calcium lors des essais de croissance bactérienne. En effet, ce produit contient 5 % de calcite et de dolomite [184], ainsi que d'autres minéraux pouvant se dégrader à la même température que le carbonate de calcium. Ces impuretés sont présentes en faibles quantités dans l'Attigel et peuvent présenter une forte diversité, elles ne seront donc pas prises en compte dans le calcul de la teneur des échantillons en CaCO_3 et leur nature ne sera pas déterminée. Les résidus solides obtenus à partir des essais conduits en milieu épaissi présentent donc une perte de masse entre 600°C et 800°C lorsqu'ils sont analysés par analyse thermogravimétrique (ATG), et il convient de déduire cette masse de la mesure afin de pouvoir calculer la quantité réelle de carbonate de calcium biogénéré en milieu épaissi.

Pour cette raison, un échantillon témoin a été réalisé dans les mêmes conditions que l'essai de croissance, en triplicat. 100 mL de milieu LNW stérile sont préparés et stockés durant 35 jours. Après centrifugation et séchage du milieu LNW, 58 g/L (+/- 0,8 g/L) de culot sec ont été récupérés, ce qui correspond à peu près à la concentration de l'Attigel dans le milieu, tous les autres composés (Welan, lactate de calcium et extrait de levure) étant solubles et donc éliminés lors du rinçage du culot. Cette valeur est inférieure de 2 % à la concentration théorique d'Attigel dans le milieu. Cette différence peut être due à la présence de composés solubles dans l'Attigel étant lessivés lors de l'étape de rinçage ou à des pertes de solides au cours des étapes successives de centrifugation et de rinçage. L'analyse par ATG du résidu sec obtenu montre 3 pics de perte de masse entre 100 et 1000°C (Figure 154) :

- Deux pics de dégradation à basse température, entre 200 et 250°C puis entre 400 et 450°C. Ces plages de températures n'étant pas utilisées pour le calcul de la teneur en CaCO_3 des échantillons, ces pics peuvent être ignorés ;
- Un pic de dégradation du CaCO_3 entre 600 et 750°C, représentant une perte de masse 5,3 % (+/- 0,3 %).

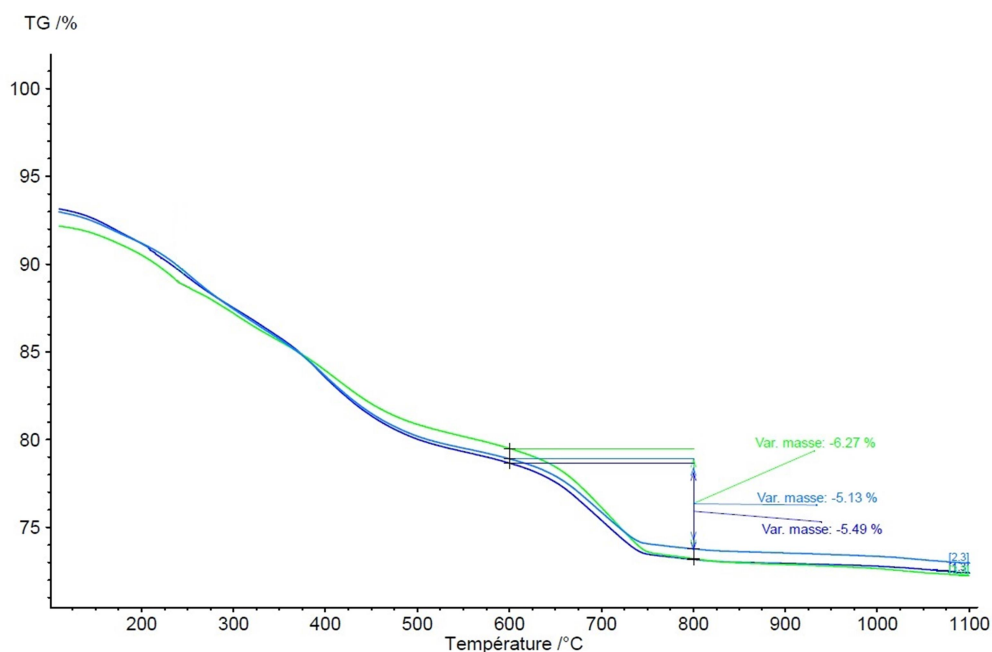


Figure 154 : Courbe d'ATG de suspensions LNW stériles après centrifugation, rinçage et séchage.

La perte de masse mesurée entre 600 et 800°C est due à la dégradation d'une mole de CaCO_3 en une mole de CaO et une mole de CO_2 , c'est donc la masse de CO_2 formé qui est mesurée. La masse de CaCO_3 dans le solide analysé est donc obtenue en multipliant la valeur mesurée par le ratio entre la masse molaire du CaCO_3 et la masse molaire du CO_2 . Par conséquent, avec une perte de masse moyenne de 5,6 % (+/- 0,6 %), le culot analysé contient 12,8 % (+/- 1,3 %) de carbonate de calcium. Ces mesures permettent de déduire que le milieu LNW contient 7,4 g/L (+/- 0,7 g/L) de carbonate de calcium et de composés se dégradant aux mêmes températures. Cette valeur sera soustraite à la teneur en carbonate de calcium mesurée à l'issue des essais en milieu épaissi, afin de déterminer la quantité de carbonate de calcium produite par biominéralisation.

Tableau 38 : Détermination de la teneur en CaCO_3 initiale du milieu LNW.

	LNGW 1	LNGW 2	LNGW 3
Masse totale échantillon (g)	70,258	63,380	54,999
Masse culot sec (g)	4,115	3,638	3,108
Masse culot sec (g/L)	58,573	57,401	56,508
Perte ATG mesurée (%)	5,49	5,13	6,27
Equivalent CaCO_3 dans le culot (%)	12,5 %	11,7 %	14,3 %
Equivalent CaCO_3 dans l'échantillon (g/L)	7,31	6,70	8,06

La Figure 155 présente l'ATG des résidus secs obtenus à la fin d'un essai de croissance, réalisé à 20°C en milieux LNG et LNGW depuis un inoculum concentré. Le graphe révèle une perte de masse progressive jusqu'à 600°C résultant de la dégradation de la matière organique composant la biomasse. Cette dernière comprend les bactéries elles-mêmes ainsi que l'ensemble du biofilm qui a pu être formé au cours de la croissance bactérienne. Du fait de la présence d'épaississants en grandes quantités, la proportion de carbonate de calcium dans l'échantillon épaissi par rapport à la masse de culot sec est deux fois plus faible que dans le milieu non épaissi, bien que la quantité de CaCO_3 récupéré soit supérieure.

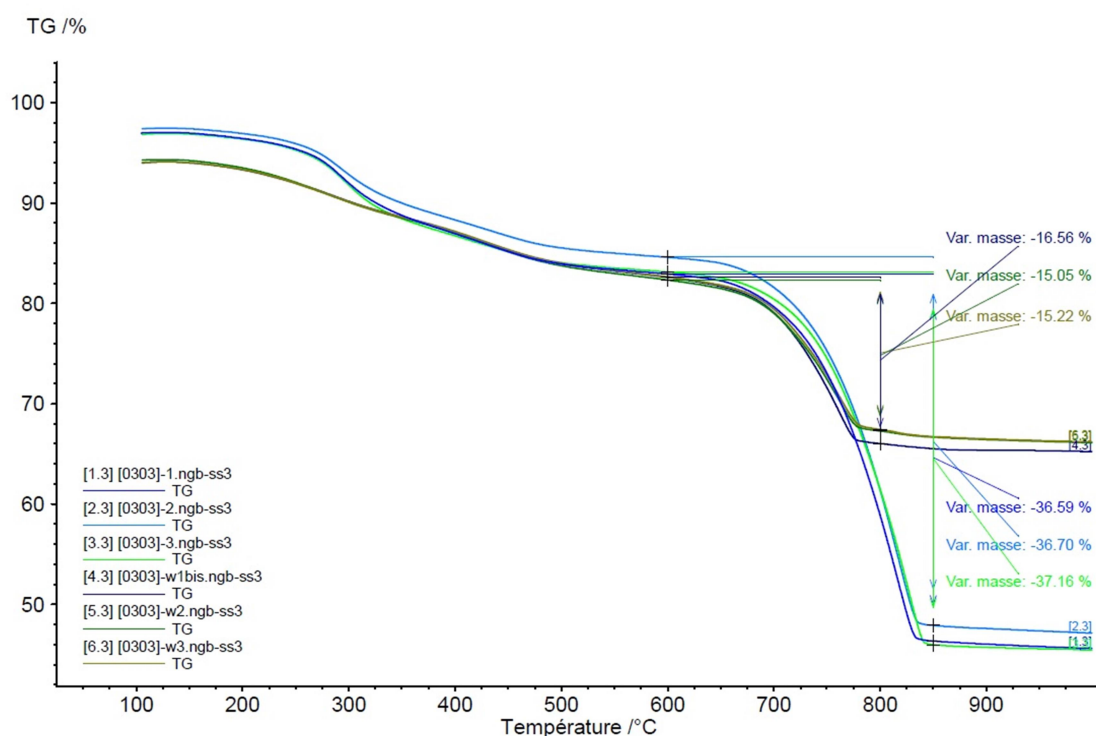


Figure 155 : ATG d'un essai de croissance à 20°C en milieu LNG et LNGW, depuis un inoculum concentré.

Références bibliographiques

- [1] E. V. Sargent, C. Mitchell, and R. E. Brubaker, "Respiratory Effects of Occupational Exposure to an Epoxy Resin System," *Arch. Environ. Heal. An Int. J.*, vol. 31, no. 5, pp. 236–240, 1976.
- [2] M. C. S. Ribeiro, J. M. L. Reis, A. J. M. Ferreira, and A. T. Marques, "Thermal expansion of epoxy and polyester polymer mortars - Plain mortars and fibre-reinforced mortars," *Polym. Test.*, vol. 22, no. 8, pp. 849–857, 2003.
- [3] V. Achal, A. Mukherjee, D. Kumari, and Q. Zhang, "Biomineralization for sustainable construction – A review of processes and applications," *Earth-Science Rev.*, vol. 148, pp. 1–17, 2015.
- [4] W. De Muynck, N. De Belie, and W. Verstraete, "Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review," *Ecol. Eng.*, vol. 36, no. 2, pp. 118–136, Feb. 2010.
- [5] J. Ducasse-Lapeyresse, "‘‘Étude du potentiel d’autocicatrisation et de biocicatrisation de matériaux cimentaires fissurés’’, Thèse de Doctorat, Université Lille 1 et Université de Sherbrooke," Ecole des Mines de Douai, 2014.
- [6] Centre d’Information sur le Ciment et ses Applications, "Tome 1 : Les constituants des bétons et des mortiers," in *Fiches techniques CIMbéton*, 2005.
- [7] B. Kerkhoff, "Effects of Substances on Concrete and Guide to Protective Treatment," *Portl. Cem. Assoc.*, pp. 1–36, 2007.
- [8] H. Mihashi and T. Nishiwaki, "Development of Engineered Self-Healing and Self-Repairing Concrete-State-of-the-Art Report," *J. Adv. Concr. Technol.*, vol. 10, no. 5, pp. 170–184, 2012.
- [9] K. Van Breugel, "Is there a market for self-healing cement-based materials," *Proc. First Int. Conf. Self Heal. Mater.*, no. April, pp. 1–9, 2007.
- [10] CEN - European Committee for Standardization, "Design of concrete structures - Part 1-1: General rules and rules for buildings.," *CEN, Brussels*, 2004.
- [11] B. Hilloulin, D. Hilloulin, F. Grondin, A. Loukili, and N. De Belie, "Mechanical regains due to self-

healing in cementitious materials: Experimental measurements and micro-mechanical model," *Cem. Concr. Res.*, vol. 80, 2016.

- [12] P. Ghods and K. Karadakis, "Modeling the chloride-induced corrosion initiation of steel rebar in concrete Outline :," in *COMSOL Conference 2009 Boston*, 2009.
- [13] Y. S. Choi and E. I. Yang, "Effect of calcium leaching on the pore structure, strength, and chloride penetration resistance in concrete specimens," *Nucl. Eng. Des.*, vol. 259, pp. 126–136, 2013.
- [14] C. Clear, "Effect of autogenous healing upon the leakage of water through cracks in concrete," *Tech. Rep. - Cem. Concr. Assoc. Vol.*, 1985.
- [15] J. F. Marquez, M. Sanchez-Silva, and J. Husserl, "Review of reinforced concrete biodeterioration mechanisms," *Proc. 8th Int. Conf. Fract. Mech. Concr. Concr. Struct. Fram. 2013*, pp. 2088–2096, 2013.
- [16] C. Lors, F. Feugeas, and B. Tribollet, *Interactions Matériaux-Microorganismes*. EDP Sciences, 2016.
- [17] M. Collepardi, "Ettringite formation and sulfate attack on concrete," *Aci Spec. Publ. 200*, vol. 200, no. 6, pp. 21–38, 2001.
- [18] J. Kropp and H. K. Hilsdorf, "Performance criteria for concrete durability," *Perform. criteria Concr. Durab.*, 1995.
- [19] F. Pacheco-Torgal and J. A. Labrincha, "Biotech cementitious materials: Some aspects of an innovative approach for concrete with enhanced durability," *Constr. Build. Mater.*, vol. 40, pp. 1136–1141, Mar. 2013.
- [20] N. Grassie and M. I. Guy, "Degradation of Epoxy Polymers : 3 Photo-degradation of Bisphenol-A Diglycidyl Ether," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 13, no. 1985, pp. 249–259, 1985.
- [21] N. Hearn, "Self-sealing , autogenous healing and continued hydration : What is the difference ?," *Mater. Struct.*, vol. 31, no. October, pp. 563–567, 1998.
- [22] M. Wu, B. Johannesson, and M. Geiker, "A review: Self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material," *Constr. Build. Mater.*, vol. 28,

no. 1, pp. 571–583, Mar. 2012.

- [23] M. Argouges, “‘Etude des mecanismes et de la cinetique de l’autocicatrisation dans des mortiers cimentaires fissurés’, Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke,” 2010.
- [24] H. Huang, G. Ye, and D. Damidot, “Characterization and quantification of self-healing behaviors of microcracks due to further hydration in cement paste,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 52, pp. 71–81, Oct. 2013.
- [25] M. Ismail, “Etude des transferts et de leurs interactions avec la cicatrisation pour prolonger la durée de service des infrastructures. Thèse de Doctorat,” INSA Toulouse, 2006.
- [26] R. Gagné and M. Argouges, “A study of the natural self-healing of mortars using air-flow measurements,” *Mater. Struct.*, vol. 45, no. 11, pp. 1625–1638, Apr. 2012.
- [27] P. Pimienta, G. Chanvillard, J. Jaurès, C. Marne, M. La, and V. Cedex, “Durability of UHPFRC specimens kept in various aggressive environments,” *Proc. 10DBMC Int. Conférence Durab. Build. Mater. Components*, no. April, p. on CD-Rom, 8 pages, 2005.
- [28] M. Kunieda, K. Choonghyun, N. Ueda, and H. Nakamura, “Recovery of Protective Performance of Cracked Ultra High Performance-Strain Hardening Cementitious Composites (UHP-SHCC) Due to Autogenous Healing,” *J. Adv. Concr. Technol.*, vol. 10, no. 9, pp. 313–322, 2012.
- [29] S. Granger, a. Loukili, G. Pijaudier-Cabot, and G. Chanvillard, “Experimental characterization of the self-healing of cracks in an ultra high performance cementitious material: Mechanical tests and acoustic emission analysis,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 37, no. 4, pp. 519–527, Apr. 2007.
- [30] D. Homma, H. Mihashi, and T. Nishiwaki, “Self-Healing Capability of Fibre Reinforced Cementitious Composites,” *J. Adv. Concr. Technol.*, vol. 7, no. 2, pp. 217–228, 2009.
- [31] S. Qian, J. Zhou, M. R. R. de Rooij, E. Schlangen, G. Ye, and K. van Breugel, “Self-healing behavior of strain hardening cementitious composites incorporating local waste materials,” *Cem. Concr. Compos.*, vol. 31, no. 9, pp. 613–621, Oct. 2009.
- [32] S. Jacobsen, J. Marchand, and H. Hornain, “SEM Observations of the microstructure of frost deteriorated and self-healed concrete,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 1781–1790, 1995.
- [33] S. Jacobsen and E. J. Sellevold, “Self-healing of high strength concrete after deterioration by

freeze/thaw," *Cem. Concr. Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 55–62, 1996.

- [34] M. Şahmaran, S. B. Keskin, G. Ozerkan, and I. O. Yaman, "Self-healing of mechanically-loaded self consolidating concretes with high volumes of fly ash," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 30, no. 10, pp. 872–879, Nov. 2008.
- [35] P. Termkhajornkit, T. Nawa, Y. Yamashiro, and T. Saito, "Self-healing ability of fly ash–cement systems," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 31, no. 3, pp. 195–203, Mar. 2009.
- [36] S. H. Na, Y. Hama, M. Taniguchi, O. Katsura, T. Sagawa, and M. Zakaria, "Experimental Investigation on Reaction Rate and Self-healing Ability in Fly Ash Blended Cement Mixtures," *J. Adv. Concr. Technol.*, vol. 10, no. 7, pp. 240–253, 2012.
- [37] L. Kan and H. Shi, "Investigation of self-healing behavior of Engineered Cementitious Composites (ECC) materials," *Constr. Build. Mater.*, vol. 29, pp. 348–356, Apr. 2012.
- [38] M. Maes, D. Snoeck, and N. De Belie, "Chloride penetration in cracked mortar and the influence of autogenous crack healing," *Constr. Build. Mater.*, vol. 115, pp. 114–124, 2016.
- [39] D. Palin, V. Wiktor, and H. M. Jonkers, "Autogenous healing of marine exposed concrete: Characterization and quantification through visual crack closure," *Cem. Concr. Res.*, vol. 73, pp. 17–24, 2015.
- [40] J. C. Orr *et al.*, "Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms," *Nature*, vol. 437, no. 7059, pp. 681–6, 2005.
- [41] J. Parks, M. Edwards, P. Vikesland, and A. Dudi, "Effects of Bulk Water Chemistry on Autogenous Healing of Concrete," *J. Mater. Civ. Eng.*, vol. 22, no. 5, pp. 515–524, May 2010.
- [42] H. Huang and G. Ye, "Simulation of self-healing by further hydration in cementitious materials," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 34, no. 4, pp. 460–467, Apr. 2012.
- [43] J. Ducasse-Lapeyresse, R. Gagné, C. Lors, and D. Damidot, "Traitement de mortiers fissurés par biocicatrisation : vers une évaluation quantitative de l'efficacité bactérienne," *Matériaux Tech.*, vol. 102, no. 105, p. 105, 2014.
- [44] D. Snoeck, P. Dubruel, and N. De Belie, "Microfibres and hydrogels to promote autogenous healing in cementitious materials," in *Fourth International Conference on Self Healing*

Materials, 2013, pp. 17–20.

- [45] T. Kishi, T. Ahn, A. Hosoda, S. Suzuki, and H. Takaoka, "Self-Healing Behaviour By Cementitious Recrystallization of Cracked Concrete," *First Int. Conf. Self Heal. Mater.*, no. April, pp. 1–10, 2007.
- [46] A. E. M. Abd Elmoaty, a. E. M. Abd-Elmoaty, and A. E. M. Abd Elmoaty, "Self-healing of polymer modified concrete," *Alexandria Eng. J.*, vol. 50, no. 2, pp. 171–178, Jun. 2011.
- [47] Z. Yang, J. Hollar, X. He, and X. Shi, "A self-healing cementitious composite using oil core/silica gel shell microcapsules," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 33, no. 4, pp. 506–512, Apr. 2011.
- [48] B. Hilloulin, K. Van Tittelboom, E. Gruyaert, N. De Belie, and A. Loukili, "Design of polymeric capsules for self-healing concrete," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 55, pp. 298–307, 2015.
- [49] B. J. Blaiszik, N. R. Sottos, and S. R. White, "Nanocapsules for self-healing materials," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 68, no. 3–4, pp. 978–986, Mar. 2008.
- [50] H. Huang and G. Ye, "the Effects of Capsules on Self-Healing Efficiency in Cementitious Materials," *Second Int. Conf. Microstruct. Durab. Cem. Compos.*, no. April, pp. 11–13, 2012.
- [51] A. Kanellopoulos, P. Giannaros, and A. Al-Tabbaa, "The effect of varying volume fraction of microcapsules on fresh, mechanical and self-healing properties of mortars," *Constr. Build. Mater.*, vol. 122, pp. 577–593, 2016.
- [52] K. Van Tittelboom, N. De Belie, D. Van Loo, and P. Jacobs, "Self-healing efficiency of cementitious materials containing tubular capsules filled with healing agent," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 33, no. 4, pp. 497–505, Apr. 2011.
- [53] J. Feiteira, E. Gruyaert, and N. De Belie, "Self-healing of moving cracks in concrete by means of encapsulated polymer precursors," *Constr. Build. Mater.*, vol. 102, pp. 671–678, 2016.
- [54] T. S. Qureshi, A. Kanellopoulos, and A. Al-Tabbaa, "Encapsulation of expansive powder minerals within a concentric glass capsule system for self-healing concrete," *Constr. Build. Mater.*, vol. 121, pp. 629–643, 2016.
- [55] S. Sangadji and E. Schlangen, "Mimicking bone healing process to self repair concrete structure novel approach using porous network concrete," *Procedia Eng.*, vol. 54, pp. 315–326, 2013.

- [56] A. Jefferson, C. Joseph, R. Lark, B. Isaacs, S. Dunn, and B. Weager, "A new system for crack closure of cementitious materials using shrinkable polymers," *Cem. Concr. Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 795–801, May 2010.
- [57] C. Dupraz, R. P. Reid, O. Braissant, A. W. Decho, R. S. Norman, and P. T. Visscher, "Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats," *Earth-Science Rev.*, vol. 96, no. 3, pp. 141–162, Oct. 2009.
- [58] S. Castanier, "Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view," *Sediment. Geol.*, vol. 126, pp. 9–23, 1999.
- [59] T. T. More, J. S. S. Yadav, S. Yan, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli, "Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications," *J. Environ. Manage.*, vol. 144, pp. 1–25, 2014.
- [60] X. Wang, H. C. Schröder, and W. E. G. Müller, "Enzyme-based biosilica and biocalcite: biomaterials for the future in regenerative medicine.," *Trends Biotechnol.*, vol. 32, no. 9, pp. 441–447, 2014.
- [61] J. T. DeJong, B. M. Mortensen, B. C. Martinez, and D. C. Nelson, "Bio-mediated soil improvement," *Ecol. Eng.*, vol. 36, no. 2, pp. 197–210, Feb. 2010.
- [62] F. Hammes and W. Verstraete, "Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 1, no. Morita 1980, pp. 3–7, 2002.
- [63] W. Stumm and J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, NewYork., 1996.
- [64] N. K. Dhami and S. M. Reddy, "Biofilm and Microbial Applications in Biomineralized Concrete," *Adv. Top. Biominer.*, no. 2, p. 174, 2012.
- [65] J. Xu and W. Yao, "Non-ureolytic bacterial carbonate precipitation as a surface treatment strategy on cement-based materials," *J. Mater. Civ. Eng.*, vol. 26, no. 5, pp. 983–991, 2014.
- [66] S. Stocks-fischer, J. K. Galinat, and S. S. Bang, "Microbiological precipitation of CaCO₃," vol. 31, 1999.
- [67] J. Tourney and B. T. Ngwenya, "The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology," *Chem. Geol.*, vol. 386, pp. 115–132, 2014.

- [68] C. Jansson and T. Northen, "Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 21, no. 3, pp. 365–371, 2010.
- [69] W. De Muynck, K. Cox, N. De Belie, and W. Verstraete, "Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete," *Constr. Build. Mater.*, vol. 22, no. 5, pp. 875–885, May 2008.
- [70] K. L. Bachmeier, A. E. Williams, J. R. Warmington, and S. S. Bang, "Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation," *J. Biotechnol.*, vol. 93, no. 2, pp. 171–181, Feb. 2002.
- [71] N. K. Dhami, M. S. Reddy, and M. S. Mukherjee, "Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review," *Front. Microbiol.*, vol. 4, no. OCT, pp. 1–13, 2013.
- [72] Y. Ç. Erşan, E. Hernandez-sanabria, N. Boon, and N. De Belie, "Enhanced crack closure performance of microbial mortar through nitrate reduction," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 70, pp. 159–170, 2016.
- [73] Y. Ç. Erşan, H. Verbruggen, I. De Graeve, W. Verstraete, N. De Belie, and N. Boon, "Nitrate reducing CaCO₃ precipitating bacteria survive in mortar and inhibit steel corrosion," *Cem. Concr. Res.*, vol. 83, pp. 19–30, 2016.
- [74] G. Lear and G. D. Lewis, *Microbial biofilms : current Research and Applications*, Univserist. Caister Academic Press, 2012.
- [75] P. D'Abzac, "Composition , extraction et rôle dans la fixation des éléments métalliques des polymères extracellulaires issus de biomasses épuratoires granulaires anaérobies," Université de Limoges, 2010.
- [76] E. D. Hondjuila Miokono, "Biodétérioration de mortiers avec une succession de bactéries sulfoxydantes neutrophiles et acidophiles, thèse de doctorat, Ecole des Mines de Douai," 2013.
- [77] A. W. Decho, "Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms?," *Ecol. Eng.*, vol. 36, no. 2, pp. 137–144, Feb. 2010.
- [78] O. Braissant, a. W. Decho, C. Dupraz, C. Glunk, K. M. Przekop, and P. T. Visscher, "Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals," *Geobiology*, vol. 5, no. 2007, pp. 401–411,

Dec. 2007.

- [79] A. Rao, J. K. Berg, M. Kellermeier, and D. Gebauer, "Sweet on biomineralization: effects of carbohydrates on the early stages of calcium carbonate crystallization," *Eur. J. Mineral.*, vol. 26, no. February, pp. 537–552, Aug. 2014.
- [80] C. Dupraz and P. T. Visscher, "Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats," *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 9, pp. 429–438, 2005.
- [81] P. Taylor and H. L. Ehrlich, "Microbes as Geologic Agents : Their Role in Mineral Formation Microbes as Geologic Agents : Their Role," no. August 2011, pp. 37–41, 2010.
- [82] C. Rodriguez-Navarro, C. Jimenez-Lopez, A. Rodriguez-Navarro, M. T. Gonzalez-Muñoz, and M. Rodriguez-Gallego, "Bacterially mediated mineralization of vaterite," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 71, no. 5, pp. 1197–1213, Mar. 2007.
- [83] M. a. Rivadeneyra, G. Delgado, a. Ramos-Cormenzana, and R. Delgado, "Biomineralization of carbonates by Halomonas eurihalina in solid and liquid media with different salinities: Crystal formation sequence," *Res. Microbiol.*, vol. 149, no. 4, pp. 277–287, 1998.
- [84] P. Anbu, C.-H. Kang, Y.-J. Shin, and J.-S. So, "Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, 2016.
- [85] B. Jones and X. Peng, "Multiphase calcification associated with the atmophytic cyanobacterium *Scytonema julianum*," *Sediment. Geol.*, vol. 313, pp. 91–104, 2014.
- [86] A. Sánchez-Navas, A. Martín-Algarra, M. Sánchez-Román, C. Jiménez-López, F. Nieto, and A. Ruiz-Bustos, "Crystal Growth of Inorganic and Biomediated Carbonates and Phosphates," in *Advanced topics on Crystal Growth*, InTech, Ed. InTech, 2013.
- [87] M. Dade-Robertson, C. Ramirez Figueroa, and M. Zhang, "Material ecologies for synthetic biology: Biomineralization and the state space of design," *CAD Comput. Aided Des.*, vol. 60, pp. 28–39, 2014.
- [88] N. Kaur, M. S. Reddy, and A. Mukherjee, "Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 5, pp. 707–714, 2013.

- [89] S. S. Bang, J. K. Galinat, and V. Ramakrishnan, "Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, no. 4–5, pp. 404–409, Mar. 2001.
- [90] S. Sangadji, V. Wiktor, H. Jonkers, and E. Schlangen, "The use of alkaliphilic bacteria-based repair solution for porous network concrete healing mechanism," *Procedia Eng.*, vol. 171, pp. 606–613, 2017.
- [91] Société AMONIT, "Fiche produit : patine par biominéralisation CALCITE (R) BIOPATINE," www.amonit.fr, 2013.
- [92] G. Le Métayer-Levrel *et al.*, "Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony," *Sediment. Geol.*, vol. 126, no. 1, pp. 25–34, Jul. 1999.
- [93] J.-P. Adolphe, J.-F. Loubière, J. Paradas, and F. Soleilhavoup, "Procédé de traitement biologique d'une surface artificielle," European patent No. 90400G97.0, 1990.
- [94] P. Tiano, L. Biagiotti, and G. Mastromei, "Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation," *J. Microbiol. Methods*, vol. 36, no. 1–2, pp. 139–145, May 1999.
- [95] J. Dick *et al.*, "Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species," *Biodegradation*, vol. 17, no. 4, pp. 357–367, Aug. 2006.
- [96] C. Jimenez-Lopez, C. Rodriguez-Navarro, G. Piñar, F. J. Carrillo-Rosúa, M. Rodriguez-Gallego, and M. T. Gonzalez-Muñoz, "Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone," *Chemosphere*, vol. 68, no. 10, pp. 1929–36, Aug. 2007.
- [97] Q. Chunxiang, W. Jianyun, W. Ruixing, and C. Liang, "Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO_3 by *Bacillus pasteurii*," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 4, pp. 1273–1280, May 2009.
- [98] D. Muynck and D. Belie, "Improvement of concrete durability with the aid of bacteria," *Proc. first Int. Conf. Self Heal. Mater.*, no. April, pp. 1–11, 2007.
- [99] H. K. K. Kim, S. J. J. Park, J. I. I. Han, and H. K. K. Lee, "Microbially mediated calcium carbonate

precipitation on normal and lightweight concrete,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 38, pp. 1073–1082, Jan. 2013.

- [100] G. D. O. Okwadha and J. Li, “Biocontainment of polychlorinated biphenyls (PCBs) on flat concrete surfaces by microbial carbonate precipitation,” *J. Environ. Manage.*, vol. 92, no. 10, pp. 2860–2864, Oct. 2011.
- [101] R. Wang, C. Qian, J. Wang, R. Wang, and J. Wang, “Bio-deposition of a calcite layer on cement-based materials by brushing with agar-immobilised bacteria,” *Adv. Cem. Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 185–192, Aug. 2011.
- [102] A. M. Grabiec, J. Klama, D. Zawal, and D. Krupa, “Modification of recycled concrete aggregate by calcium carbonate biodeposition,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 34, pp. 145–150, Sep. 2012.
- [103] H. M. Jonkers, A. Thijssen, G. Muyzer, O. Copuroglu, and E. Schlangen, “Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete,” *Ecol. Eng.*, vol. 36, no. 2, pp. 230–235, Feb. 2010.
- [104] M. Luo, C. X. Qian, and R. Y. Li, “Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 87, pp. 1–7, 2015.
- [105] M. Luo and C. Qian, “Influences of bacteria-based self-healing agents on cementitious materials hydration kinetics and compressive strength,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 121, pp. 659–663, 2016.
- [106] L. Xu, M. Dong, H. Gong, M. Sun, and Y. Li, “Effects of inorganic cations on the rheology of aqueous welan, xanthan, gellan solutions and their mixtures,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 121, pp. 147–154, 2015.
- [107] H. M. Jonkers and E. Schlangen, “Development of a bacteria-based self healing concrete,” *Proc. int. FIB Symp.*, vol. 1, pp. 425–430, 2008.
- [108] V. Achal, A. Mukerjee, M. S. Reddy, and M. Sudhakara Reddy, “Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 48, pp. 1–5, Nov. 2013.
- [109] S. A. Abo-El-Enein, A. H. Ali, and F. N. Talkhan, “Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of cement mortar,” *HBRC J.*, vol. 9, no. 1, pp. 36–

40, 2013.

- [110] N. Chahal and R. Siddique, "Permeation properties of concrete made with fly ash and silica fume: Influence of ureolytic bacteria," *Constr. Build. Mater.*, vol. 49, pp. 161–174, Dec. 2013.
- [111] N. Chahal, R. Siddique, and A. Rajor, "Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete," *Constr. Build. Mater.*, vol. 28, no. 1, pp. 351–356, Mar. 2012.
- [112] R. Siddique and N. K. Chahal, "Effect of ureolytic bacteria on concrete properties," *Constr. Build. Mater.*, vol. 25, no. 10, pp. 3791–3801, Oct. 2011.
- [113] P. Ghosh, S. Mandal, B. D. D. Chattopadhyay, and S. Pal, "Use of microorganism to improve the strength of cement mortar," *Cem. Concr. Res.*, vol. 35, no. 10, pp. 1980–1983, Oct. 2005.
- [114] J. Y. Y. Wang, H. Soens, W. Verstraete, and N. De Belie, "Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores," *Cem. Concr. Res.*, vol. 56, pp. 139–152, Feb. 2014.
- [115] J. Wang *et al.*, "Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete : a promising strategy for crack self-healing," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. October, pp. 1–14, 2015.
- [116] D. Palin, V. Wiktor, and H. M. Jonkers, "A bacteria-based bead for possible self-healing marine concrete applications," *Smart Mater. Struct.*, 2016.
- [117] J. Y. Y. Wang *et al.*, "Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete," *Constr. Build. Mater.*, vol. 68, pp. 110–119, Oct. 2014.
- [118] V. Wiktor and H. M. Jonkers, "Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 33, no. 7, pp. 763–770, Aug. 2011.
- [119] H. M. Jonkers, "Bacteria-based self-healing concrete," *HERON*, vol. 56, no. 1, pp. 1–12, 2011.
- [120] S. a. L. de Koster, R. M. M. Mors, H. W. W. Nugteren, H. M. M. Jonkers, G. M. H. Meesters, and J. R. van Ommen, "Geopolymer Coating of Bacteria-containing Granules for Use in Self-healing Concrete," *Procedia Eng.*, vol. 102, pp. 475–484, 2015.
- [121] J. Y. Wang, N. De Belie, and W. Verstraete, "Diatomaceous earth as a protective vehicle for

bacteria applied for self-healing concrete," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 4, pp. 567–577, 2012.

- [122] H. Chen, C. Qian, and H. Huang, "Self-healing cementitious materials based on bacteria and nutrients immobilized respectively," *Constr. Build. Mater.*, vol. 126, pp. 297–303, 2016.
- [123] Y. Ç. Erşan, F. B. Da Silva, N. Boon, W. Verstraete, and N. De Belie, "Screening of bacteria and concrete compatible protection materials," *Constr. Build. Mater.*, vol. 88, pp. 196–203, 2015.
- [124] F. Bravo Da Silva, N. De Belie, N. Boon, and W. Verstraete, "Production of non-axenic ureolytic spores for self-healing concrete applications," *Constr. Build. Mater.*, vol. 93, pp. 1034–1041, 2015.
- [125] Y. Ç. Erşan, E. Gruyaert, G. Louis, C. Lors, N. De Belie, and N. Boon, "Self-protected nitrate reducing culture for intrinsic repair of concrete cracks," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. November, 2015.
- [126] J. Wang, K. Van Tittelboom, N. De Belie, and W. Verstraete, "Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete," *Constr. Build. Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 532–540, Jan. 2012.
- [127] E. G. Manger, "Porosity and Bulk Density of Sedimentary Rocks," *Geol. Survery Bull.*, no. 1144–E, p. 62, 1963.
- [128] R. Pei, J. Liu, S. Wang, and M. Yang, "Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 39, pp. 122–130, May 2013.
- [129] B. Chattopadhyay, M. Biswas, S. Ghosh, and S. Mandal, "Microbial activity on microstructures of concrete," *1st Int. Conf. Microstruct. Relat. Durab. Cem. Compos.*, no. October, pp. 805–814, 2008.
- [130] J. Ducasse-Lapeyresse, R. Gagné, C. Lors, and D. Damidot, "Effect of calcium gluconate, calcium lactate, and urea on the kinetics of self-healing in mortars," *Constr. Build. Mater.*, vol. 157, pp. 489–497, 2017.
- [131] M. T. Bassuoni and M. L. Nehdi, "Resistance of self-consolidating concrete to ammonium sulphate attack," *Mater. Struct.*, vol. 45, no. 7, pp. 977–994, 2012.

- [132] Newcastle University, "Use of 'BacillaFilla' for bioremediation of concrete cracks," *Newcastle University 2010 iGEM competition*, 2010. .
- [133] R. S. Hoskeri, S. I. Mulla, and H. Z. Ninnekar, "Biodegradation of chloroaromatic pollutants by bacterial consortium immobilized in polyurethane foam and other matrices," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 3, no. 4, pp. 390–396, 2014.
- [134] S. S. Bang, J. J. Lippert, U. Yerra, S. Mulukutla, and V. Ramakrishnan, "Microbial calcite, a bio-based smart nanomaterial in concrete remediation," *Int. J. Smart Nano Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 28–39, Mar. 2010.
- [135] S. A. Abo-El-Enein and A. Ali, "Utilization of microbial induced calcite precipitation for sand consolidation and mortar crack remediation," *HBRC J.*, vol. 8, no. 3, pp. 185–192, 2012.
- [136] S. K. Ramachandran, "Remediation of Concrete Using Micro-organisms," *ACI Mater. J.*, no. 98, pp. 3–9, 2001.
- [137] K. Van Tittelboom, N. De Belie, W. De Muynck, and W. Verstraete, "Use of bacteria to repair cracks in concrete," *Cem. Concr. Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 157–166, Jan. 2010.
- [138] V. Wiktor and H. M. Jonkers, "Field performance of bacteria-based repair system: Pilot study in a parking garage," *Case Stud. Constr. Mater.*, vol. 2, pp. 0–6, 2015.
- [139] C. Qian, L. Ren, B. Xue, and T. Cao, "Bio-mineralization on cement-based materials consuming CO₂ from atmosphere," *Constr. Build. Mater.*, vol. 106, pp. 126–132, 2016.
- [140] D. J. Nowak, "Atmospheric Carbon Reduction by Urban Trees," *J. Environ. Manage.*, vol. 37, pp. 207–217, 1993.
- [141] D. R. Picout and S. B. Ross-Murphy, "Rheology of Biopolymer Solutions and Gels," *Sci. World J.*, vol. 3, pp. 105–121, 2003.
- [142] M. Guvendiren, H. D. Lu, and J. a. Burdick, "Shear-thinning hydrogels for biomedical applications," *Soft Matter*, vol. 8, no. 2, p. 260, 2012.
- [143] C. Viseras, C. Aguzzi, P. Cerezo, and a. Lopez-Galindo, "Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products," *Appl. Clay Sci.*, vol. 36, no. 1–3, pp. 37–50, 2007.
- [144] M. A. Faers, T. H. Choudhury, B. Lau, K. McAllister, and P. F. Luckham, "Syneresis and rheology

of weak colloidal particle gels,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 288, no. 1–3, pp. 170–179, 2006.

- [145] InTechOpen, “Sodium alginate reaction,” 2012. [Online]. Available: http://www.intechopen.com/source/html/37702/media/image2_w.jpg.
- [146] Q. V. Nguyen, D. P. Huynh, J. H. Park, and D. S. Lee, “Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: a review,” *Eur. Polym. J.*, 2015.
- [147] T. McLellan, “Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH,” *Anal. Biochem.*, vol. 126, no. 1, pp. 94–99, 1982.
- [148] S. C. S. Martins, C. M. Martins, and S. T. Santaella, “Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater review,” *African J. Biotechnol.*, vol. 2013, no. 28, pp. 4412–4418, 2013.
- [149] N. Dayan, *Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide*. Scrivener Publishing, 2017.
- [150] P. A. Ciullo and R. T. Vanderbilt, “Rheological properties of magnesium aluminum silicate / xanthan gum dispersions,” *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 285, pp. 275–285, 1981.
- [151] V. C. Kelessidis, E. Poulakakis, and V. Chatzistamou, “Use of Carbopol 980 and carboxymethyl cellulose polymers as rheology modifiers of sodium-bentonite water dispersions,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 54, no. 1, pp. 63–69, 2011.
- [152] L. M. Bezerril, C. L. de Vasconcelos, T. N. C. Dantas, M. R. Pereira, and J. L. C. Fonseca, “Rheology of chitosan-kaolin dispersions,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 287, no. 1–3, pp. 24–28, 2006.
- [153] X. Ma and M. Pawlik, “Role of background ions in guar gum adsorption on oxide minerals and kaolinite,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 313, no. 2, pp. 440–448, 2007.
- [154] a. M. Sani and K. K. Mohanty, “Incorporation of clay nano-particles in aqueous foams,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 340, no. 1–3, pp. 174–181, 2009.
- [155] W. Lynwood Haden and I. A. Schwint, “Attapulgit : its properties and applications.,” *Ind. Eng. Chem.*, vol. 59, no. 9, 1967.

- [156] M. Piatko, "Edible Foamable Compositions Comprising Clay Particles," US patent number 20100178410, 2015.
- [157] D. A. Braz, "Particle-stabilised foams and foam films," University of Hull, 2009.
- [158] A. Fameau and A. Salonen, "Effect of particles and aggregated structures on the foam stability and aging," *Comptes Rendus Phys.*, vol. 15, no. 8–9, pp. 748–760, 2014.
- [159] H. Lünsdorf, R. W. Erb, W. R. Abraham, and K. N. Timmis, "'Clay hutchies': A novel interaction between bacteria and clay minerals," *Environ. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 161–168, 2000.
- [160] C. Chenu, "Clay- or sand-polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil : water related properties and microstructure.," *Geoderma*, vol. 56, pp. 143–156, 1993.
- [161] A. Alimova *et al.*, "Bacteria-Clay interaction: Structural changes in smectite induced during biofilm formation," *Clays Clay Miner.*, vol. 57, no. 2, pp. 205–212, 2009.
- [162] M. Barr, "Adsorption Studies on clays, II.," *J. Am. Pharm. Assoc.*, vol. 46, no. 8, pp. 4–6, 1957.
- [163] L. S. England, H. Lee, and J. T. Trevors, "Bacterial survival in soil: Effect of clays and protozoa," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 25, no. 5, pp. 525–531, 1993.
- [164] C. E. Heijnen, C. H. Hok-A-Hin, and J. a. Van Veen, "Improvements to the use of bentonite clay as a protective agent, increasing survival levels of bacteria introduced into soil," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 24, no. 6, pp. 533–538, 1992.
- [165] K. C. Marshall, "Clay Mineralogy in Relation to Survival of Soil Bacteria," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 13, no. 1, pp. 357–373, 1975.
- [166] M. J. Vieira and L. F. Melo, "Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens*," *Water Science and Technology*, vol. 32, no. 8, pp. 45–52, 1995.
- [167] L. N. Warr, J. N. Perdrial, M.-C. C. Lett, A. Heinrich-Salmeron, and M. Khodja, "Clay mineral-enhanced bioremediation of marine oil pollution," *Appl. Clay Sci.*, vol. 46, no. 4, pp. 337–345, 2009.
- [168] Y. Zhou *et al.*, "Influence of clay minerals on the *Bacillus halophilus* Y38 activity under anaerobic condition," *Appl. Clay Sci.*, vol. 50, no. 4, pp. 533–537, 2010.

- [169] W. X. Shi, Y. S. Duan, X. S. Yi, S. Wang, N. Sun, and C. Ma, "Biological removal of nitrogen by a membrane bioreactor-attapulgitic clay system in treating polluted water," *Desalination*, vol. 317, pp. 41–47, 2013.
- [170] J. Hrenovic, D. Tibljias, T. Ivankovic, D. Kovacevic, and L. Sekovanic, "Sepiolite as carrier of the phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*," *Appl. Clay Sci.*, vol. 50, no. 4, pp. 582–587, 2010.
- [171] C. Gao, "Potential of Welan Gum as mud thickener," *J. Pet. Explor. Prod. Technol.*, vol. 5, no. 1, pp. 109–112, 2015.
- [172] K. K. Unger, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, and H. Kral, "Characterization of porous solids," in *Studies in Surface Science and Catalysis*, 1988, p. 560.
- [173] B. Abu-Jdayil, "Rheology of sodium and calcium bentonite-water dispersions: Effect of electrolytes and aging time," *Int. J. Miner. Process.*, vol. 98, no. 3–4, pp. 208–213, 2011.
- [174] V. L. Campo, D. F. Kawano, D. B. da Silva, and I. Carvalho, "Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 2, pp. 167–180, 2009.
- [175] E. Galan, "Properties and Applications of Palygorskite-Sepiolite Clays," *Clay Miner.*, vol. 31, no. 4, pp. 443–453, 1996.
- [176] D. P. Chattopadhyay and M. S. Inamdar, "Aqueous behaviour of chitosan," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2010, 2010.
- [177] M. Dressler, P. Fischer, and E. J. Windhab, "Rheological Characterization and Modeling of Aqueous Guar Gum Solutions," in *3rd International Symposium on Food Rheology and Structure*, 2003.
- [178] S. C. A. França, C. N. Barbato, M. Nele, and J. C. Pinto, "Studies of kaolin rheology," in *IX Jornadas Argentinas de Tratamiento de Minerales*, 2008.
- [179] V. Crescenzi, M. Dentini, T. Coviello, and R. Rizzo, "Comparative analysis of the behavior of gellan gum (S-60) and welan gum (S-130) in dilute aqueous solution," *Carbohydr. Res.*, vol. 149, no. 2, pp. 425–432, 1986.

- [180] S. Campana, C. Andrade, M. Milas, and M. Rinaudo, "Polyelectrolyte and rheological studies on the polysaccharide welan," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 12, no. 6, pp. 379–384, 1990.
- [181] A.-L. Fameau, A. Saint-Jalmes, and F. Cousin, "Smart Foams: Switching Reversibly between Ultrastable and Unstable Foams," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 36, pp. 8264–8269, 2011.
- [182] F. Shafa and M. R. J. Salton, "Disaggregation of Bacterial Cell Walls by Anionic Detergents," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 22, no. 137, pp. 187–141, 1960.
- [183] P.-C. Aïtcin and R. J. Flatt, "6 - Entrained air in concrete: rheology and freezing resistance," in *Science and Technology of Concrete Admixtures*, Woodhead Publishing, Ed. Elsevier Ltd., 2016, pp. 87–89.
- [184] BASF Corporation, "Attagel rheology modifiers : guidelines," 2007.
- [185] V. Kaur, M. B. Bera, P. S. Panesar, H. Kumar, and J. F. Kennedy, "Welan gum: Microbial production, characterization, and applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 65, pp. 454–461, 2014.
- [186] S. Khanlari and M. A. Dubé, "Bioadhesives: A review," *Macromol. React. Eng.*, vol. 7, no. 11, pp. 573–587, 2013.
- [187] C. Piccirillo *et al.*, "Antimicrobial activity of methylene blue and toluidine blue O covalently bound to a modified silicone polymer surface," pp. 6167–6171, 2009.
- [188] B. P. De Oliveira *et al.*, "In Vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms," *Brazilian J. Oral Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 55–59, 2014.
- [189] D. Gantenbein and J. Schoelkopf, "Determining the size distribution-defined aspect ratio of platy particles," *Appl. Clay Sci.*, vol. 53, no. 4, pp. 544–552, 2015.
- [190] M. G. Sierra-Beltran, H. M. M. Jonkers, and E. Schlangen, "Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair," *Constr. Build. Mater.*, vol. 67, pp. 344–352, Sep. 2014.
- [191] K. D. Young, "Bacterial morphology: why have different shapes?," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 10, no. 6, pp. 596–600, 2007.
- [192] K. D. Young, "The Selective Value of Bacterial Shape," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 3,

pp. 660–703, 2006.

- [193] M. Ismail, A. Toumi, R. François, and R. Gagné, “Effect of crack opening on the local diffusion of chloride in cracked mortar samples,” *Cem. Concr. Res.*, vol. 38, no. 8–9, pp. 1106–1111, 2008.
- [194] E. Kazamia, A. S. Riseley, C. J. Howe, and A. G. Smith, “An Engineered Community Approach for Industrial Cultivation of Microalgae,” *Ind. Biotechnol.*, vol. 10, no. 3, pp. 184–190, 2014.

